

10754541

7/20/04

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/30872 A1

(51) 国際特許分類: C07C 235/08,
231/12, 231/18, A61K 31/164, A61P 9/00, 9/10, 35/00,
29/00, 27/02, 3/10, 11/00 // C07M 7:00

Tadakazu) [JP/JP]. 西川正純 (NISHIKAWA, Masazumi)
[JP/JP]; 〒300-4295 茨城県つくば市和台16-2 マルハ
株式会社 中央研究所内 Ibaraki (JP). 森 謙治 (MORI,
Kenji) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都文京区向丘1-20-6-
1309 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08992

(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 12 日 (12.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-311485
2000 年 10 月 12 日 (12.10.2000) JP

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手
町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): マル
ハ株式会社 (MARUHA CORPORATION) [JP/JP]; 〒
100-8608 東京都千代田区大手町1丁目1番2号 Tokyo
(JP).

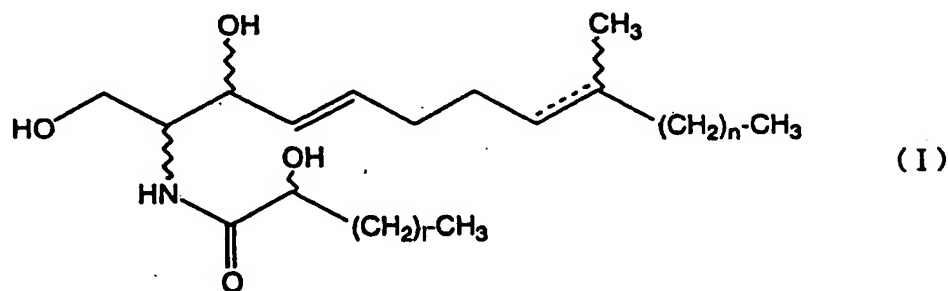
添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 玉井忠和 (TAMAI,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL ALIPHATIC COMPOUNDS, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USAGE

(54) 発明の名称: 新規脂肪族化合物、その製造方法、及びその利用方法



(57) Abstract: Compounds of the general formula (I) which are each in the form of a (2R, 3S, 2'S) optical isomer when the bond at the 8-position is double or in the form of (2S, 3R, 2'RS) optical isomers when the bond at the 8-position is single, or their pharmacologically acceptable salts; a process for preparing the same; and use of the same in treatment of circulatory diseases (such as arteriosclerosis and cardiopathy), cancer, rheumatism, diabetic retinopathy, and respiratory diseases. In said formula, n is an integer of 1 to 11; and l is an integer of 1 to 16.

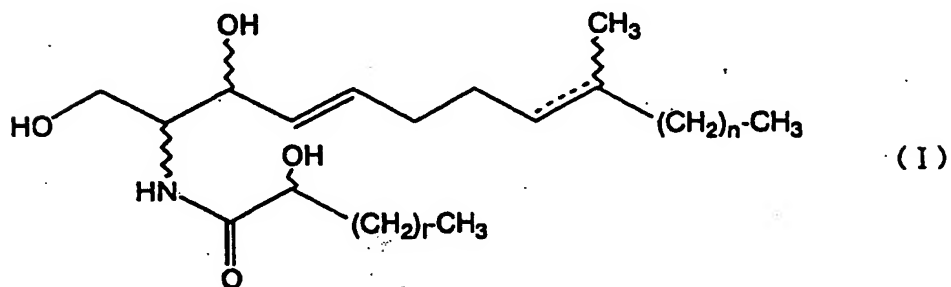
[続葉有]

WO 02/30872 A1



(57) 要約:

本発明は、式 (I)



(式中、 n は1～11の整数であり、 l は1～16の整数である)
 で表される脂肪族化合物であって、8位が二重結合である場合には、(2R、3S、2'S)の光学異性体であり、また8位が単結合である場合には、(2S、3R、2'R)の光学異性体である化合物またはその薬理学的に許容される塩、その製造方法及びその化合物の循環器系疾患（例えば、動脈硬化症、心臓疾患）、がん、リウマチ、糖尿病性網膜症及び呼吸器系疾患の治療における利用を提供する。

明細書

新規脂肪族化合物、その製造方法、及びその利用方法

5 技術分野

本発明は新規脂肪族化合物、その製造方法、及び脂肪族化合物を有効成分とする医薬に関する。

背景技術

止血過程で、活性化血小板から放出される α 類粒には、セロトニン、ADPなどとともに脂肪族誘導体2-アミノ-3-ヒドロキシ-4-オクタデセン-1-リン酸、2-amino-3-hydroxy-4-octadecene-1-phosphate (AHOP) が含まれるが、セロトニンは血管収縮、ADPは血小板凝集を、それぞれ示し、どちらも止血を促進するが、一方、AHOPについてはその役割が未知であった。近年、AHOPを内因性リガンドとするオーファン受容体である、内皮分化遺伝子endothelial differentiation gene (Edg) が見い出され、AHOPとEdgの結合が、血行動態悪化や血管平滑筋増殖など、動脈硬化促進性の方向に、あるいは呼吸器系疾患進行の方向に作用している可能性が示されつつある。

Edgは1990年にオーファン受容体として遺伝子がクローニングされた [Edg-1 (JBC, '90, 265, p. 9308)] が、その後、Edg-1のホモログとして、Edg-3 (BBRC, '96, 227, p. 608)、Edg-5 (AGR16/H218) (JCB, '96, 135, p. 1071) が得られたものの、その生理的役割は不明だった。ところが、'98年、AHOPがEdg-1の内因性リガンドとなっている可能性が示唆され (Science, '98, 279, p. 1552)、その後、Edg-3、及びEdg-5もAHOP特異的受容体である事が示された (BBRC '99, 260, p. 263, JBC '99, 274, 27, p. 18997)。

血管内皮細胞上のEdg-1がAHOPの刺激によって、低分子量GTP結合性タンパク質Rhoの活性化経路にてカドヘリンなど接着タンパク質をアップレ

ギュレートシ (Science' 98, 279, p. 1552)、Tリンパ球由来株化細胞が、AHOPの刺激によって、in vitro 疑似血管モデルでの血管層侵入を増長する (EMBOJ.' 98, vol. 17, No. 14, p. 4066)。また、岡島らはEdg-1、或いはEdg-3を強制発現させたCHO細胞を用い、疑似血管遊走試験を行ったところ、どちらの場合も、AHOP濃度依存的に遊走が促進された ('99年日本生化学会大会要旨集 p. 883)。一方、五十嵐らは、がん細胞株F10が疑似血管モデルにてAHOP $10^{-8} \sim 10^{-6}$ Mにて濃度依存的に最大80%ほど遊走抑制を受ける事を示したが、F10細胞ではEdg-1、或いはEdg-3は殆ど発現しておらず、Edg-5が発現していた ('99年日本生化学会)。このことについて、発現亜種が異なる事が原因となつて、AHOPが遊走抑制を示した可能性が指摘されている ('99年生化学会大会要旨集 p. 675, 883)。

血管平滑筋細胞 (Eur. J. Biochem.' 98, 257, p. 403)、或いは気道平滑筋細胞 (Biochem. J.' 99, 338, p. 643) で、
15 どちらも、AHOP応答性にMAPキナーゼ活性化が観察されており、AHOPが血管平滑筋細胞増殖の方向に作用する可能性が指摘されている。

杉山らは、ラットにAHOPを尾静脈経路で投与し血行動態を観察したところ、収縮期血圧、及び左心室圧時間微分の二指標の有意な低下を観察し、AHOPが、in vivoにおいて、心機能低下の方向に作用している可能性を示した ('
20 00年薬理学会要旨集 P. 127)。

AHOPがムスカリン受容体内向きK⁺整流を活性化し不整脈を引き起こす可能性が指摘されている ('99 Pfugers Arch-Eur J Physiol 438, pp. 642-648) 事より、Edg受容体拮抗物質が不整脈に奏効する可能性を考える事ができる。

25 血管内皮細胞に及ぼすAHOPの作用を、血管新生動物モデルを用いて検討した結果、VEGF、やFGF-2などの増殖因子による血管新生を、AHOPがEdg-1、Edg-3と結合する事によって相乗的に促進させ、Edgがリウマチ、固形がんや糖尿病性網膜症の進行に作用している可能性が指摘されている (Cell' 99, p. 301)。

AHOPとEdg受容体の結合によって引き起こされる過剰な炎症や気道のリモデリングの結果、肺炎、慢性閉塞性気道疾患（COPD: chronic obstructive airway disease）、呼吸器系高血圧が進行する可能性が指摘されている（Pulmonary Pharmacology & Therapeutics' 2000, 13, p. 99）。

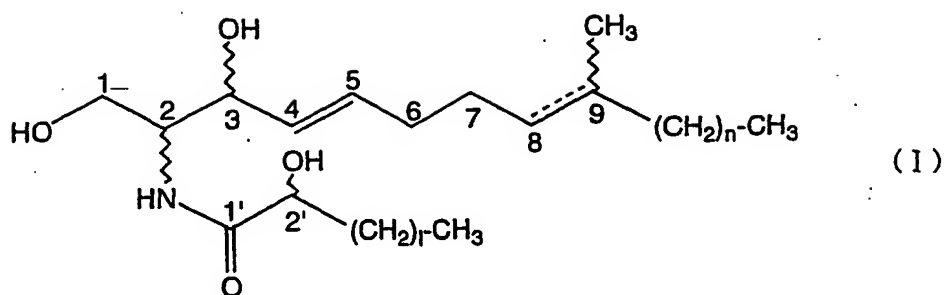
原虫トリパノゾーマの撲滅薬、スラミンがEdg-3特異的な拮抗性を示し、AHOPとEdgの結合のシグナルを阻止する事が報じられている（J. B. C.' 99, 274, 27, p. 18997）。スラミンは動脈硬化病態モデルに治癒的に奏効する事が示されている（Circulation,' 99, Cardiovascular Res., '94, 28, p. 1166）が、この薬効の機作にEdg拮抗性が絡んでいる可能性が考えられる。

これらの知見を総合すると、AHOPがEdgと結合すると、炎症性細胞活性化や血管平滑筋細胞増殖、血行動態悪化など動脈硬化促進的に作用し、また、血管新生を促進し、リウマチ、固形がん、糖尿病性網膜症の進行の方向に作用する可能性が示されている事になる。即ち、Edgに拮抗する物質が、抗循環器系疾患性（例えば、抗動脈硬化性、抗心臓疾患性（例えば、抗不整脈性、抗心筋梗塞性）、抗リウマチ性、抗がん性、抗糖尿病性網膜症性や抗呼吸器系疾患性を示す可能性が考えられる。

本発明者らは、上記の点に鑑み、鋭意研究を行った結果、下記式（I）～（V）で示される化合物を新たに発見し、これらの化合物（以下、「本発明化合物」という）がEdg受容体に拮抗する事を見い出した。本発明はこの知見に基づくものであり、その目的は、新規な脂肪族化合物、その製造方法及び医薬を提供することにある。

発明の開示

25 本発明は、式（I）



- (式中、 n は1～11の整数であり、 l は1～16の整数である)
- で表される脂肪族化合物であって、8位が二重結合である場合には、(2 R、3 S、
 5 2' S)の光学異性体であり、また8位が単結合である場合には、(2 S、3 R、
 2' R S)の光学異性体である化合物に関する。
- 尚、上記式中、波線は、(R)、(S)及びラセミ体のいずれの光学異性を含むこと
 を意味する。また、本願明細書において、上の鎖を第1鎖と呼び、下の鎖を第2
 鎖と呼ぶ。

10 図面の簡単な説明

図1は、本発明の化合物が用量依存的にEdg拮抗性を示すグラフである（ス
 ラミン：対照）。

図中、白三角は、被験物質をいれない場合のデータである。

図2は、本発明の化合物が用量依存的にAHOP競合作用を示すグラフである。

- 15 図中、白丸は、被験物質をいれない場合のデータである。

図3は、本発明の化合物が用量依存的に血管平滑筋細胞増殖の抑制作用を示す
 グラフである（スラミン：対照）。

図中、白四角は、被験物質をいれない場合のデータであり、また、*：陰性対照
 に対し、危険率 $p \leq 5\%$ にて有意に抑制、**：陰性対照に対し、危険率 $p \leq 1\%$
 20 にて有意に抑制を示す。

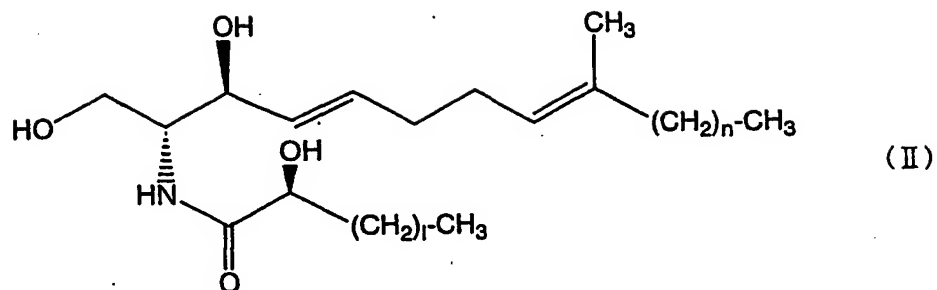
図4は、内皮細胞－好中球相互作用に及ぼす本発明の化合物の作用を示し、ま
 た、**：コントロールに対し、危険率 $p \leq 1\%$ にて有意に抑制を示す。

発明を実施するための最良の形態

好ましい態様としては、以下のものがあげられる。

- 25 本発明は、前記式(I)の化合物が下記の式(II)である化合物を提供する。

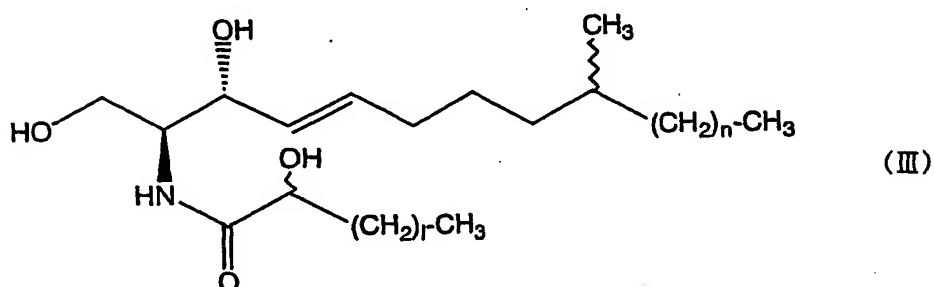
式 (I I)



5 (式中、n及びlは式(I)化合物の記号の字義と同一である。)

本発明は、前記式(I)の化合物が式(I I I)である化合物を提供する。

式 (I I I)



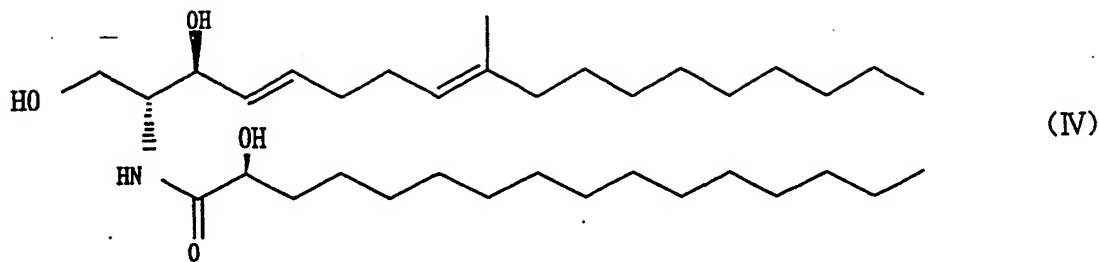
10

(式中l及びnは式(I)化合物の記号の字義と同一である。)

本発明の式(I)、(I I)及び(I I I)の化合物において、好ましくは、nは1~10であり、またlは1~15である、さらに好ましくは、nは1~8であり、またlは1~13である。

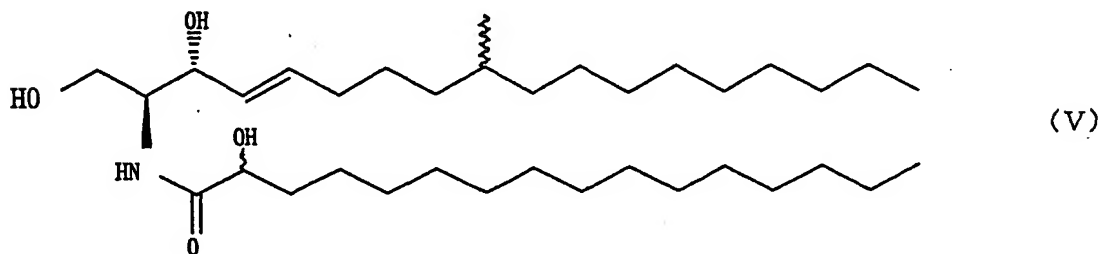
15 また、本発明は、前記式(I)の化合物が式(I V)である化合物：(4 E, 8 E, 2 R, 3 S, 2' S) - N - 2' - ヒドロキシヘキサデカノイル - 9 - メチル - 4, 8 - オクタデカジエン - 1, 3 - ジオールを提供する。

式 (I V)



本発明は、前記式 (I) の化合物が式 (V) である化合物：(4 E, 2 S, 3 R, 2' R S) -N-2'-ヒドロキシヘキサデカノイル-9-メチル-4-オクタ
 5 デセン-1, 3-ジオールを提供する。

式 (V)



本発明の化合物はその薬理学的に許容される塩を形成することもでき、その塩
 としては、特に制限されないが、例えば、フッ素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、
 10 ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸鉛、リン
 酸塩、炭酸塩などの無機酸塩、メタンスルホン酸塩、トリフロオロメタンスルホ
 ン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルキルスルホン酸塩、ベンゼンスルホ
 ン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などのアリールスルホン酸塩、酢酸塩、フマ
 ル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの
 15 カルボン酸塩、グリシン塩、アラニン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩な
 どのアミノ酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩などがあげら
 れる。

本発明化合物はいずれも内皮分化遺伝子 (Edg) 受容体拮抗性を示し、Edg
 受容体に対するAHOP、スフィンゴシルフォスフォリルコリンなどのEdg

受容体作動物質の結合に拮抗し、これらによる細胞内シグナル伝達系を阻止することができる。

従って、本発明は、式 (I) ~ (V) の化合物を有効成分として含有する、内皮分化遺伝子 (E d g) 受容体に拮抗する医薬を提供する。

- 5 また、本発明は、炎症性細胞活性化や血管平滑筋増殖、血行動態悪化、さらに血管新生によって生じる疾患、例えば、循環器系疾患（例えば、動脈硬化、心臓疾患（例えば、心筋梗塞、不整脈）、リウマチ（例えば、慢性関節リウマチ）、がん、糖尿病性網膜症、呼吸器系疾患（例えば、肺炎、慢性閉塞性気道疾患、呼吸器系高血圧）を治療するための上記医薬を提供する。

- 10 ここで、「治療」とは予防も包含する。

ここで、「循環器系疾患」とは、血液、リンパなどの循環状態が障害され、組織や細胞に障害をおこしている疾患をいい、例としては、動脈硬化性疾患（例えば、アテローム（粥状）硬化症）、心臓疾患（例えば、心筋梗塞、不整脈）がある。

- 15 ここで、「呼吸器系疾患」とは、気管、気管支、肺などの呼吸器が障害されている疾患及びそれに関連した症候をいい、例としては、喘息（即時型、遅発型、アレルギー性喘息等）、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、好酸球浸潤、気管支炎（慢性気管支炎等）、気道炎症、肺気腫、肺炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、急性呼吸窮迫症候群、呼吸器系高血圧、呼吸困難、疼痛、咳、痰、嘔吐、息切れがある。

- 20 本発明の化合物を医薬として用いるためには、固体組成物、液体組成物およびその他の組成物のいずれの形態でもよく、必要に応じて最適のものが選択される。医薬組成物は、本発明の化合物を常用の賦形剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、pH 調節剤、溶解剤、などを添加し、常用の製剤技術によって、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、粉剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤などに調製することができる。

- 25 賦形剤、増量剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

製剤の酸化を防止するためには、酸化防止剤（トコフェロール等）を添加した

り、シクロデキストリン等の包接剤で包接したり、ゼラチン等の皮膜でカプセル化することができる。

- 更に、前記化合物を、乳化剤として、リン脂質あるいは非イオン界面活性剤を用いて、O/W型製剤として、特開平6-298642に記載のように調製することができる。乳化剤は、単独あるいは2種以上組み合わせて使用でき、添加量は、適宜でよいが、0.001~10% (W/V)、好ましくは0.01~5% (W/V) である。

- リン脂質としては、大豆由来リン脂質、卵黄由来リン脂質、リゾレシチン、フォスファチジルコリン (レシチン)、フォスファチジルセリンなどの単独あるいは組み合わせが使用可能である。非界面活性剤としては、分子量500~1500のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロック共重合体 (例えば、ブルニックF-68)、分子量1000~10000のポリアルキレングリコール、分子量1000~20000のポリオキシアルキレン共重合体、硬化ヒマシ油ポリオキシアルキレン誘導体、ヒマシ油ポリオキシアルキレン誘導体、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油、硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ショ糖脂肪酸エステルなどの単独あるいは組み合わせが好適に用いられるがこれに限定されない。

- 本発明化合物は、約0.0001~約100mg/kg体重/日を1日1回又は数回に分けて経口又は非経口で投与することができる。この投与量は疾患の種類、患者の年齢、体重、症状により適宜増減することができる。

本発明の化合物は、以下の製造法によって製造することができる。

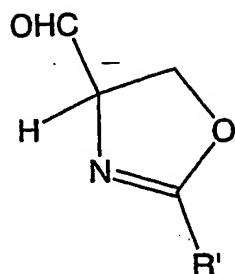
(合成例1)

- 式(I)の化合物の製造法について、反応原料の調製例を含めて以下に説明する。

(1) 反応原料の調製例

(A) オキサゾリンアルデヒド誘導体の合成

下記式のオキサゾリンアルデヒド誘導体は従来法で合成することができる。



〔式中R' はアルキル基またはアリール基である、R' は好ましくはアリール基（例えば、フェニル基である）〕

- 5 例えば、(L)-セリンを出発原料にする場合には以下のように製造することができる。

(L)-セリンをそのエステル（例えば、Meエステル）へ変換する（Ber. Dtsch. Chem. Ges. 39, 2949 (1906)）。ここで、セリンは、目的化合物の第1鎖の光学異性が、2R-異性体である場合には、R-セリンを用い、2S-異性体である場合には、S-セリンを用いる。

- 10 次に、生じるセリンエステルをエリオット条件（Elliott's condition）（J. Chem. Soc. 589 (1949)）下で、イミノエーテル（例えばベンズイミノエチルエーテル）を用いて反応させ、オキサゾリンエステル誘導体を得る。ここで生成するオキサゾリンエステルは、出発物質のセリンと同じ光学異性を保ち、ラセミ化は観察されないため、目的とする光学異性体を得るために好都合である。

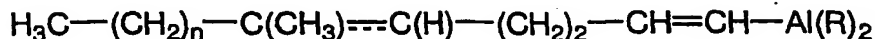
次に、生成したオキサゾリンエステル誘導体から、オキサゾリンアルデヒド誘導体を得る。

- 20 この還元反応は、金属水素化物（例えば、DIBAL-H（水素化ジイソブチルアルミニウム））共存下、不活性溶媒（例えば、ヘキサン）中で行い、反応を停止後、次に溶媒抽出（例えば、酒石酸NaK水溶液及びEtOAc）することによって行うことができる。

生成するオキサゾリンアルデヒド誘導体は不安定であるため、即座に次段階の反応に処することが好ましい。

- 25 (B)(E) 体のアルケニルアランの合成

下記式のアルケニルアランは従来法で合成することができる。



- 5 (式中nは式(I)化合物の字義と同一であり、Rはアルキル基、好ましくはi-Buである)

例えば、Rがi-Buのアルケニルアランは、アルキンにDIBAL-Hを付加することによって目的のアルケニルアランを得ることができる(J. Am. Chem. Soc. 95, 4098 (1973))。

- 10 この反応は、不活性溶媒中(例えば、ヘキサン)で、温度は、20～50℃で行うことができる。

アルケニルアランは、不安定なので、好ましくは得られた生成物のまま次の工程に用いる。なお、アルケニルアランは、生成工程に用いる物質及びその後の工程の生成物により、容易に確認できる。

- 15 上記アルケニルアラン合成の原料であるアルキンは、種々な方法で合成できるが、例えば以下の方法があげられる。

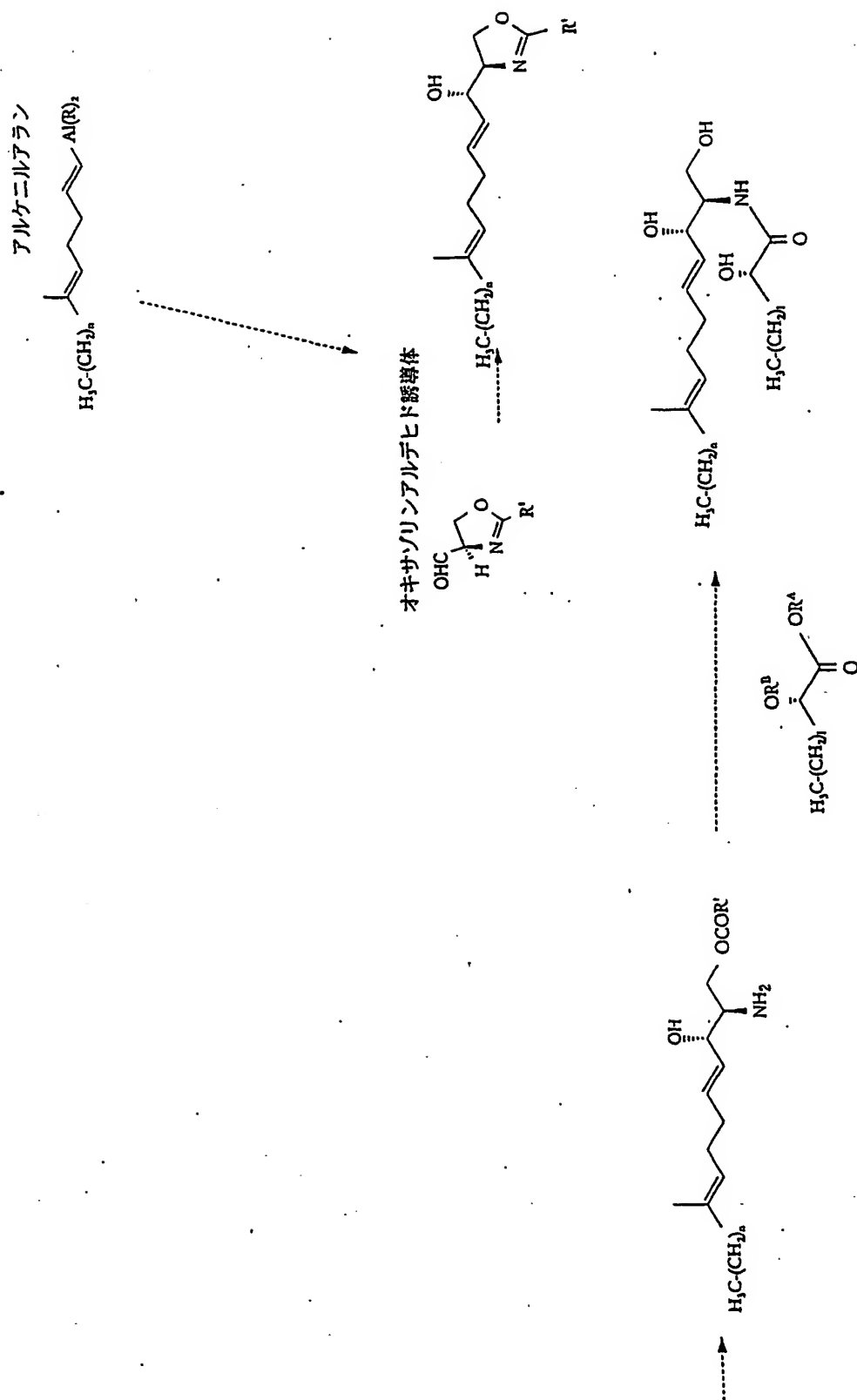
アルコール体をトシレートを経由してブロミド体に通常の方法によって変換する。ブロミド体をニトリル体に変換し、更に、金属水素化物(例えば、DIBAL-H)共存下で還元することによってアルデヒド体を得る。次に、コーリーらの方法(Tetrahedron Lett. 3769 (1972))によって、 Ph_3P と CBr_4 を用いて、アルデヒドをジプロモアルケンに変換し、さらに、強塩基(例えば、n-BuLi)存在下でアルキンを合成する。

- 20 の方法(Tetrahedron Lett. 3769 (1972))によって、 Ph_3P と CBr_4 を用いて、アルデヒドをジプロモアルケンに変換し、さらに、強塩基(例えば、n-BuLi)存在下でアルキンを合成する。

(2) 式(I)の化合物の合成

式(I)の化合物の合成スキームを以下に示す。

合成例 1
(8 位が二重結合で、(2R,3S,2'S)光学異性の場合)



- 第1工程： 上記(1)(A)で得たオキサゾリンアルデヒド誘導体を、上記(1)(B)で得たアルケニルアランでアルケニル化することによって、ジアステレオマー混合物を得る。ここで用いるオキサゾリンアルデヒド誘導体は、目的化合物の第1鎖の2位置と同じ光学異性を有するものを用い（目的化合物が2R-異性体である場合には、R-体を用い、目的化合物が2S-異性体である場合には、S-体を用いる）。

この反応は、不活性溶媒中（例えば、エーテル）で、温度は、 $-5 \sim 10^{\circ}\text{C}$ で行うことができる。

- この反応によって生じたジアステレオマー混合物は、オキサゾリンアルデヒド誘導体とアルケニルアランとの反応によって生じたOH基の光学異性が、RとSの2種の化合物を含む。従って、目的化合物に応じたジアステレオマーを分離することが好ましい（目的化合物の第1鎖の3位の光学異性が3R-異性体である場合には、R-体を分離し、目的化合物が3S-異性体である場合には、S-体を分離する）。

- ここで、ジアステレオマーの分離には、通常のカロマトグラフィーを用いることができる。

第2工程： 上記生成物を、オキサゾリン環を開環して、 NH_2 基及び $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}'$ 基を有する化合物を得る。開環は、酸（例えば、希釈HCl）の存在下で行うことができる。

- 第3工程： 開環後、目的化合物の第2鎖の2'位と同じ光学異性をもったアシル化剤によって選択的N-アシル化し、次に、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}'$ 基を脱離させることによって式(I)化合物を合成することができる。

- アシル化剤としては、 $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_1-\text{CH}(\text{OH})\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ （式中、1は式(I)化合物の字義と同一である）のエステル体（例えば、p-ニトロフェニルエステル体）を用いることができる。ここで、アシル化剤の水酸基は、保護（例えば、アセチル(Ac)で）することが好ましい。

選択的N-アシル化は、塩基性溶媒（例えば、ピリジン）中で、 $30 \sim 45^{\circ}\text{C}$ の温度で行うことができる。

$-\text{C}(=\text{O})\text{R}'$ 基の脱離は、塩基（例えば、NaOH）で行うことができ、

上記のように水酸基をAcで保護した場合には、この脱離と同時にAc基も脱離させることができる。

(合成例2)

式(I I)の化合物の製造法について、反応原料の調製例を含めて以下に説明する。

(1) 反応原料の調製例

(A) (E) 体の $\text{HC}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ の合成

ここでは、 $n=8$ の場合の (E) - 6 - メチル - 5 - ペンタデセン - 1 - インを例にして説明するが、他の n (n は、(I I) 化合物の字義と同一である) の場合は、2 - ウンデカノンの代わりに $\text{H}_3\text{CC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ を用いることによって以下の反応と同様に合成することができる。

合成例1で述べた方法を用いることもできるが、ここでは以下の方法を用いる。

2 - ウンデカノンを用いることによってメチル3 - メチル - 2 - ドデセノエートの幾何異性体を得る。

このエステルを金属水素化物 (例えば、 LiAlH_4) 下でアルコールにし、アルコール体 (E) - 3 - メチル - 2 - ドデセン - 1 - オールを含む E/Z 混合物として得る。この混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに処することにより、(E) - 異性体を分離する。

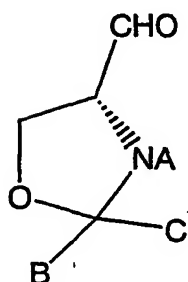
次に、(E) - 異性体の水酸基を臭素で置換することによって、(E) - 1 - ブロモ - 3 - メチル - 2 - ドデセンを得る。この反応は、水酸基を臭素で置換する反応条件で行うことができる。例えば、臭素をホスフィン (例えば、トリフェニルホスフィン) 存在下、不活性溶媒 (例えば、アセトニトリル) 中で作用させることによって行うことができる。

次に、(E) - 1 - ブロモ - 3 - メチル - 2 - ドデセンをハロゲン化プロパルギル (例えば、臭化プロパルギル) から調製したグリニャル試薬と反応させる事によって (E) - 6 - メチル - 5 - ペンタデセン - 1 - インを得る。この反応は、触媒 (例えば CuCl) 存在下、不活性溶媒 (例えば、ジエチルエーテル) 中0

～5℃の温度で行うことができる。

(B) N-保護した (R) -ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成

下記式のN-保護した (R) -ホルミルオキサゾリジン誘導体は従来法で合成
 5 n 1985、41、2379-2386) によって合成することができる。



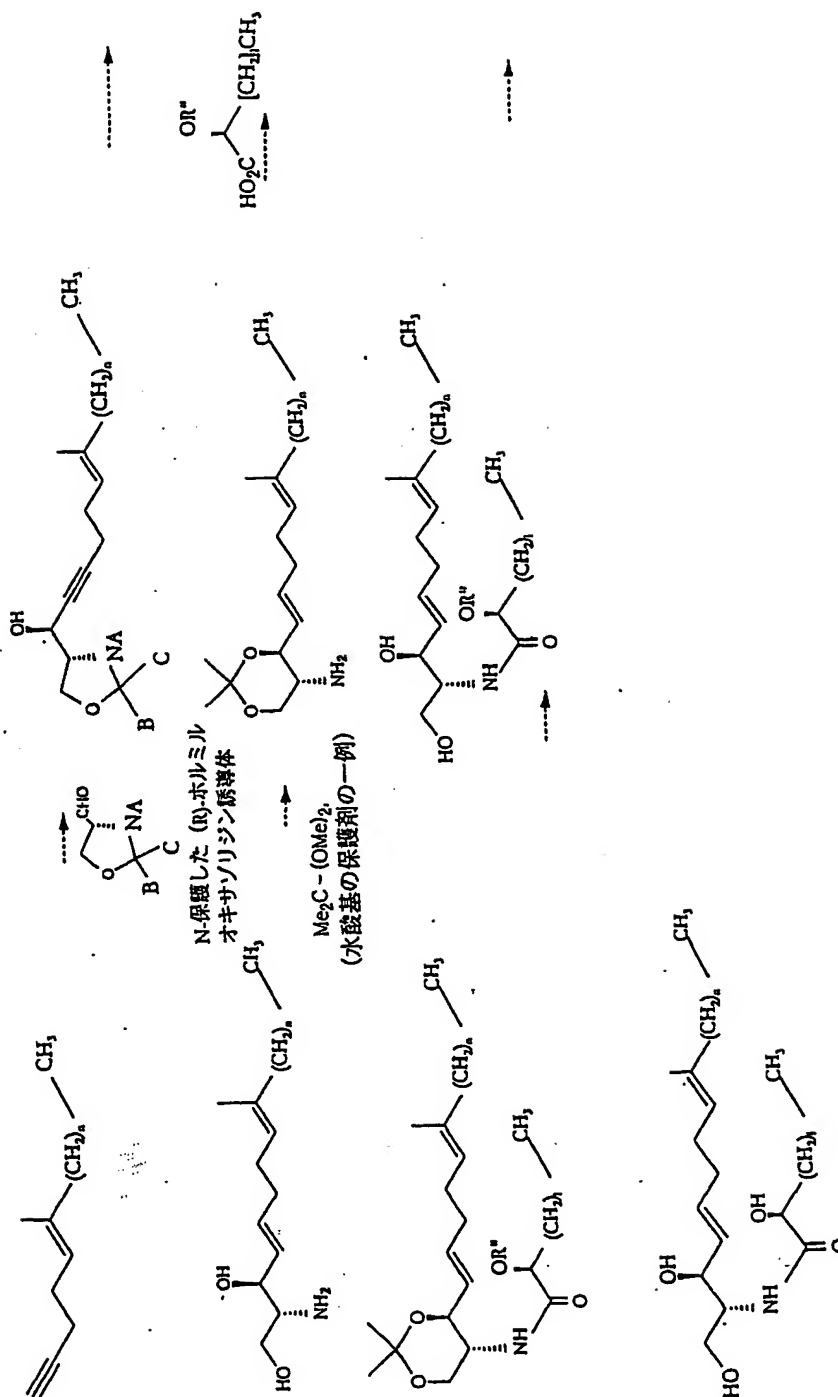
10 (式中AはNの保護基であり、B及びCはアルキル基 (例えば、メチル基) であ
 る)

 ここで、Nの保護基Aとしては、例えば、ベンジルオキシカルボニル (Z)、t-
 ブトキシカルボニル (Boc)、t-アミノオキシカルボニル (Aoc)、イソ
 ボニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロル
 15 -ベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロア
 セチル、フタロイル、ホルミル、o-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニル
 ホスフィノチオイルなどの基が挙げられる。好ましくは、Bocが用いられる。

(2) 式 (I I) の化合物の合成

 式 (I I) の化合物の合成スキームを以下に示す。

合成例 2



第1工程：上記(1)(A)で得た(E)体の $\text{HC}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ と、上記(1)(B)で得たN-保護した(R)-ホルミルオキサゾリジン誘導体とを反応させる。

第1工程の反応は、塩基(例えば、n-ブチルリチウム)下で、不活性溶媒(例えば、THF)中 $-10\sim-30^\circ\text{C}$ の温度で行うことができる。

第2工程：第1工程生成物の三重結合を(E)型二重結合に還元し、同時に、オキサゾリジンを開環しながら脱保護して、 NH_2 基及びOH基を有する化合物を得る。

第2工程の反応は、不活性溶媒(例えば、THF)中アルカリ金属とアミン(例えば、エチルアミン存在下リチウム)で、 $-70\sim-78^\circ\text{C}$ の温度で行うことができる。

第3工程：

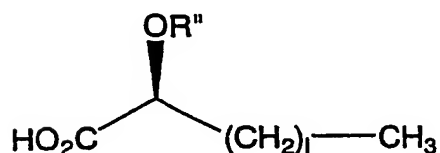
(1) 第2工程生成物を水酸基の保護剤で処理する。

ここで、水酸基の保護剤としては、例えば、2, 2-ジメトキシプロパンを用いることができ、この反応は、酸触媒(例えば、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム)存在下、不活性溶媒(例えば、トリクロロメタン)中に行うことができる。

(2) 次に、この保護した化合物と、

下記式のカルボン酸化合物：

20



(式中、 R'' はOHの保護基であり、 l は式(II)化合物と同じ字義を表す)とを反応させる。

この反応は、脱水縮合剤(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)存在下、不活性溶媒(例えば乾燥ジクロロメタン)中に行うことができる。

ここで用いたカルボン酸化合物は、森らの方法 (Liebigs Ann. Chem. 1994, 41-48) によって合成することができ、R" は、OH保護基、例えば、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 基をあげることができる。

- 5 第4工程：水酸基の保護基を脱保護し、R" 基を脱離させる。

ここで、水酸基の保護基の脱保護には、酸触媒 (例えば、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム) 存在下、不活性溶媒 (例えば、CH₂Cl₂ 及び MeOH) 中で行うことができる。TBDPS 基の脱離は、フッ素陰イオン (例えば、テトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド)、不活性溶媒 (例えば、THF) 中で行うことができる。

10

(合成例3)

式 (III) の化合物の製造法について、反応原料の調製例を含めて以下に説明する。

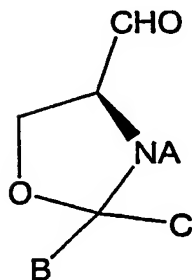
(1) 反応原料の調製例

- 15 (A) $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ の合成

H₃CC(=O)(CH₂)_nCH₃ (式中、n は式 (III) 化合物の字義と同一である) から合成例2と同様に得ることができる。

(B) N-保護した (S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成

- 20 下記式のN-保護した (S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体は従来法で合成することができ、例えば、(S)-セリンから合成例2で述べたのと同様にして合成する。



- 25 (式中AはNの保護基であり、B及びCはアルキル基 (例えば、メチル基) であ

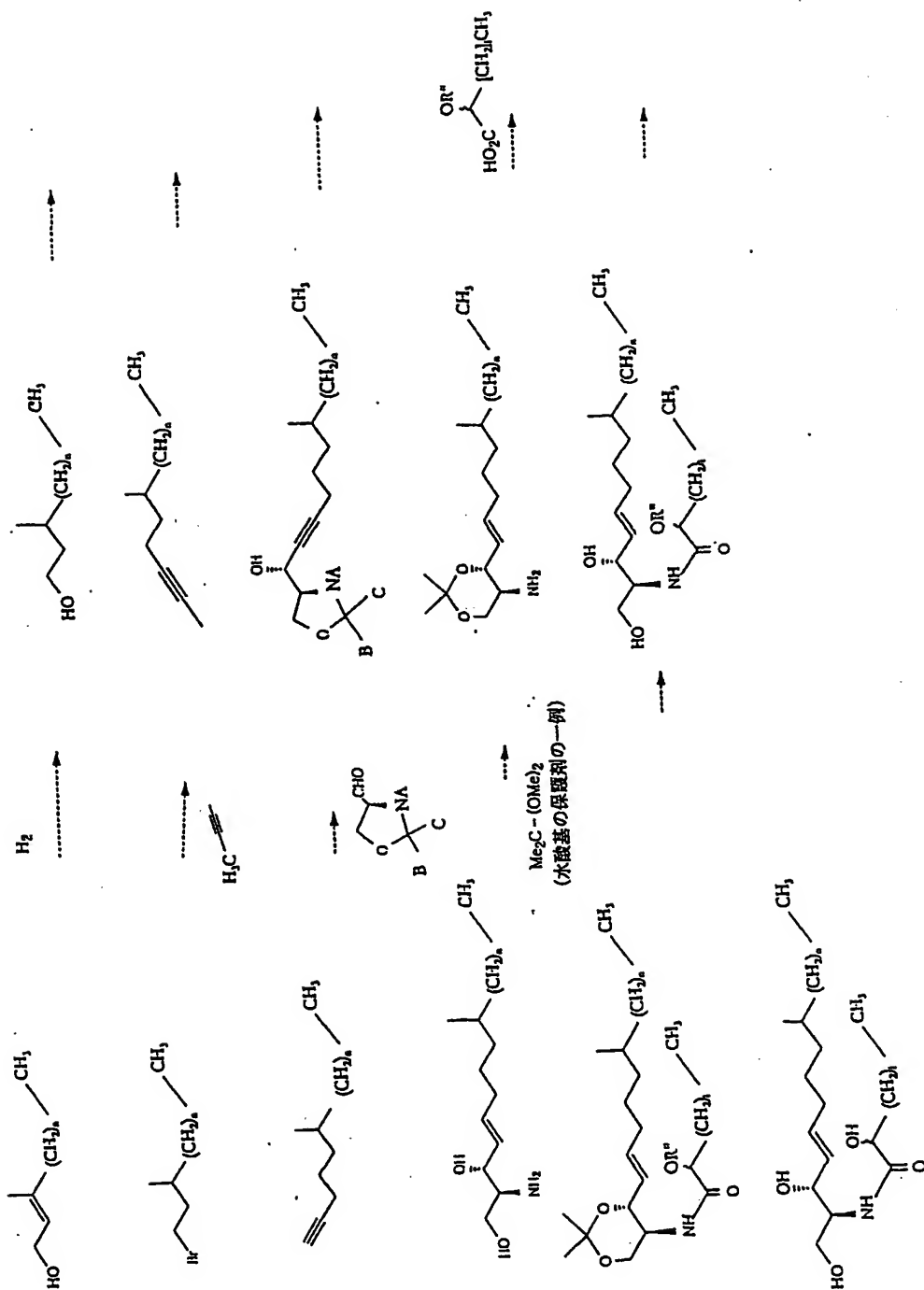
る)

- ここで、Nの保護基Aとしては、例えば、ベンジルオキシカルボニル (Z)、
t-ブトキシカルボニル (Boc)、t-アミノオキシカルボニル (Aoc)、イソ
ボニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロル
5 -ベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロア
セチル、フタロイル、ホルミル、o-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニル
ホスフィノチオイルなどの基が挙げられる。好ましくは、Bocが用いられる。

(2) 式 (I I I) の化合物の合成

式 (I I I) の化合物の合成スキームを以下に示す。

合成例 3



第1工程：上記(1)(A)で得た $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ の不飽和部分を接触還元によって飽和する。

この反応は、接触還元で通常用いられる種々な触媒下で行うことができる。例えば、パラジウム触媒（パラジウム-炭、Pd-C等）を用いることができる。

5 第2工程：第1工程生成物の水酸基を臭素で置換する。

臭素化は、アルコールを臭素化できる方法で行うことができる。例えば、トシラートにした後、臭素化することによって行うことができる。

この場合、不活性溶媒（例えば、ピリジン）中塩化パラトルエンスルホンと反応させることによってトシラートを得、次にトシラートを不活性溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド（DMF）溶液）中臭化物（例えば、臭化ナトリウム）存在下で反応させることができる。

第3工程：第2工程生成物の臭素を $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-$ で置換する。

$\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-$ 置換に用いる反応原料は、例えば、 $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-\text{Li}$ を用いることができ、 $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-\text{Li}$ の場合は、例えば、以下のように第3工程の反応を行うことができる。

プロピンの不活性溶媒（例えば、THF溶液）に（好ましくはAr下）、配位剤（例えば、テトラメチルエチレンジアミン（TMEDA））を加える。そこに、アルキルリチウム（例えば、 $n\text{-BuLi}$ ）を加えて、 $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-\text{Li}$ を得る。この際、反応温度は、 $-78\sim 0^\circ\text{C}$ が好ましい。

20 次に、ここに、第2工程生成物の溶液（例えば、ヘキサメチルホスホルアミド（HMPA）とTHFとの混合液）を加えることによって行うことができる。この際、反応温度は、 $-78\sim 20^\circ\text{C}$ が好ましい。

第4工程：第3工程生成物の三重結合の位置を末端に移動させて、末端三重結合化合物を得る。

25 第4工程の反応は、例えば、次のように行うことができる。

アミン塩基（例えば、1,3-ジアミノプロパン）に（好ましくはAr下）、アルカリ金属（例えばリチウム）を加える。この反応は、 $-78\sim -70^\circ\text{C}$ で行うのが好ましい。

次に、強塩基性アルコラート（例えば、カリウムt-ブトキシド）を加え、こ

ここに第3工程生成物を加えることによって、反応を行う。この反応は、15～25℃で行うのが好ましい。

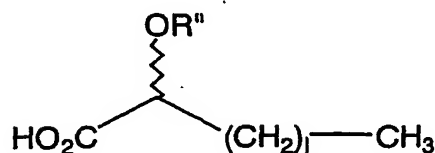
第5工程：第4工程生成物に上記(1)(B)で得たN-保護した(S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体とを反応させる。

- 5 第5工程の反応は、塩基（例えば、n-ブチルリチウム）下で、不活性溶媒（例えば、THF）中-15～-28℃の温度で行うことができる。

以下の第6工程以降は、合成例2の第2工程以降と同様に行うことができる。

- 第6工程：第4工程生成物の三重結合を(E)型二重結合に還元し、同時に、オキサゾリジンを開環しながら脱保護して、NH₂基及びOH基を有する化合物を得る。

第7工程：この(E)型二重結合化合物を水酸基の保護剤で処理し、この保護した化合物と、下記式のカルボン酸化合物：



15

（式中、R''はOHの保護基であり、1は式(III)化合物と同じ字義を表す）とを反応させる。

ここで用いた、カルボン酸化合物は、合成例2と同様に合成することができる。

第8工程：水酸基の保護基を脱保護し、R''基を脱離させる。

20 実施例

以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、これは本発明の技術範囲を限定するものではない。

実施例1 (4E, 8E, 2R, 3S, 2'S)-N-2'-ヒドロキシヘキサデカノイル-9-メチル-4, 8-オクタデカジエン-1, 3-ジオールの合成

- 25 実施例1の合成スキームは、下記に示す。



(1) 反応原料の調製(A) アルケニルアラン (8) の合成

(E)-4-メチル-3-トリデセン-1-オール (1) (33 g, 155 mmol) のピリジン (120 ml) 攪拌冷却溶液に、p-TsCl (45 g, 236 mmol) を加えた。この混合物を8時間攪拌した。次に、この混合物を氷水 (500 ml) に注ぎ、エーテル (500 ml) で抽出した。このエーテル溶液を、2N-HCl、飽和NaHCO₃水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、真空濃縮した。残さの粗油状物 (E)-4-メチル-3-トリデセン-1-トシレート (2) (58 g) をDMF (250 ml) に溶解した。

10 これに、LiBr (40 g, 460 mmol) を加え、この混合物を18時間室温で攪拌した。次に、これを氷水 (1 L) に注ぎ、エーテル (300 ml x 3) で抽出した。このエーテル溶液を水で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、真空濃縮した。残さを蒸留して、38.3 g (93.4%) の (E)-1-ブロモ-4-メチル-3-トリデセン (3) を得た。

15 DMF (100 ml) 及び水 (30 ml) 中の (E)-1-ブロモ-4-メチル-3-トリデセン (3) (38.0 g, 138 mmol) とKCN (11.5 g, 176 mmol) との混合物を70℃において24時間攪拌した。次に、これを氷水 (1 L) に注ぎ、エーテル (500 ml) で抽出した。このエーテル溶液を、水で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、真空濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーに処し、n-ヘキサン-エーテル (100:1) で溶出して、30.0 g (98%) の (E)-5-メチル-4-テトラデセンニトリル (4) を油状物として得た。

25 (E)-5-メチル-4-テトラデセンニトリル (4) (30.0 g, 136 mmol) のエーテル (700 ml) 中の攪拌冷却溶液に、DIBAL-Hのn-ヘキサン溶液 (1.7 M, 1.23 ml, 209 mmol) をアルゴンガス下-60℃において滴加した。この混合物を、-60℃において1時間、室温において3時間攪拌した。過剰な試薬をHCO₂Et (5 ml) の添加によってクエンチした。30分間攪拌後、この混合物を飽和NH₄Cl水溶液 (1.5 L) に注いだ。生じた混合物を20分間攪拌し、20% H₂SO₄水溶液 (1 L) で酸性にし、

エーテルで抽出した。このエーテル溶液を水で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、真空濃縮した。油状残さを Florisil (450 g) 上でクロマトグラフィーに処し、*n*-ヘキサン-エーテル (50:1) で溶出して、29.0 g (95.4%) の (E)-5-メチル-4-テトラデセナール (5) を得た。

- 5 CBr_4 (85 g, 256 mmol) のジクロロメタン溶液 (100 ml) を Ph_3P (138 g, 526 mmol) のジクロロメタン攪拌氷冷溶液 (300 ml) に滴加した。ここに (E)-5-メチル-4-テトラデセナール (5) (29.0 g, 129 mmol) のジクロロメタン溶液 (100 ml) を 0℃ に冷却し、攪拌しながら加え、0℃ において 15 分間攪拌した。この混合物の反応を氷冷した水 (100 ml) で停止し、20 分間攪拌後に有機層を分離した。この有機溶液を乾燥 (硫酸マグネシウム) 後真空濃縮した。残さをペンタン (1 L) で摩砕し、不溶性 $\text{Ph}_3\text{P}\text{O}$ をろ過によって除去した。ろ液を真空濃縮後、油状残さをシリカゲルカラムクロマトグラムに処し、*n*-ヘキサンで溶出し、38.1 g (77.6%) の油状 (E)-1, 1-ジブプロモ-6-メチル-1, 5-ペンタデカジエン (6) を得た。
- 10
- 15

- (E)-1, 1-ジブプロモ-6-メチル-1, 5-ペンタデカジエン (6) (37.0 g, 97.6 mmol) の THF (400 ml) の攪拌冷却溶液に *n*-BuLi の *n*-ヘキサン溶液 (1.5 M, 150 ml, 225 mmol) を Ar ガス下 -70℃ において滴加し、この混合物を -70℃ にて 1 時間、室温にて 1.5 時間攪拌した。その後、反応液を 1.5 l の氷水に注ぎ、*n*-ヘキサンで抽出した。このヘキサン溶液を水で洗浄後、硫酸ナトリウムによって乾燥し、真空濃縮した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラムに処し、*n*-ヘキサンで溶出し、(E)-6-メチル-5-ペンタデセン-1-イン (7) 18.9 g (88.0%) を油状物として得た。
- 20

- 25 (E)-6-メチル-5-ペンタデセン-1-イン (7) (1.4 g, 6.4 mmol) の *n*-ヘキサン (5 ml) 攪拌溶液に、*n*-ヘキサン中の DIBAL-H (1.7 M, 3.8 ml, 6.4 mmol) 溶液を Ar ガス存在下で滴加した。この混合物を 50℃ にて 2 時間攪拌し、生成したアルケニルアラン (8) の溶液を氷浴にて冷却した。

(B) (R) - 4 - ホルミル - 2 - フェニル - 1, 3 - オキサゾリン - 2 - エンの合成

- (R) - セリン (9) (25 g, 238 mmol) の乾燥 MeOH 溶液に HCl ガスを勢いよくバブルさせ、溶液が非常に熱くなるまで行った (自発的還流)。この溶液を室温において 16 時間放置し、次に MeOH を真空除去した。残さをエーテル (50 ml) によって摩砕した。(R) - セリン Me エステル (10) の固体をろ紙上で回収し、エーテル (50 ml) で洗浄し、真空乾燥した。MeOH - エーテル (1 : 3) から再結晶して、35.9 g (97.0%) の (R) - セリン Me エステル (10) を得た。
- ジクロロメタン (100 ml) 中 PhC (=NH) OEt (60 g, 0.4 mol) 溶液を (R) - セリン Me エステル HCl (33 g, 0.21 mol) 水溶液 (20 ml) に加えた。この混合物を室温にて 24 時間激しく攪拌した。これをろ過し、ろ液をジクロロメタン (100 ml)、及び水 (50 ml) にて希釈し、有機溶液を分離し、硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、真空濃縮した。残さを蒸留して、33.3 g の (R) - 4 - メトキシカルボニル - 2 - フェニル - 1, 3 - オキサゾリン - 2 - エン (11)、bp は 120 ~ 123 °C / 0.09 mm, $[\alpha]_D^{21} = -118.2^\circ$ (c = 1.13, CHCl₃) を得た。
- n - ヘキサン中の DIBAL - H 溶液 (1.7 M, 6.0 ml, 10.2 mmol) を (R) - 4 - メチルカルボニル - 2 - フェニル - 1, 3 - オキサゾリン - 2 - エン (11) (1.4 g, 6.8 mmol) のトルエン (30 ml) 及び n - ヘキサン (5 ml) の攪拌冷却溶液に Ar ガス下 -70 °C において滴加し、-70 °C において 2 時間攪拌した。続いて、MeOH (1 ml) を -70 °C において滴加し、30 分間攪拌後、EtOAc 溶液 (10 ml) と飽和酒石酸 NaK 水溶液 (20 ml) とを加え反応を停止した。冷浴を除くことによって温度を室温まで昇温させた。この混合物を EtOAc (500 mL) と飽和酒石酸 NaK 水溶液 (1.5 L) との間で分配し、有機溶液を硫酸マグネシウムで乾燥後、真空濃縮し、1.4 g (定量的) の (R) - 4 - ホルミル - 2 - フェニル - 1, 3 - オキサゾリン - 2 - エン (12) を粗黄色油として得た。

(2) 実施例 1 の化合物の合成

工程1： 上記(1)(A)で得たアルケニルアラン(8)の溶液に、エーテル(5 ml)中に溶解した上記(1)(B)で得た(R)-4-ホルミル-2-フェニル-1, 3-オキサゾリン-2-エン(12)(1.2 g, 約5.8 mmol)を加え0~5℃にて攪拌した。温度を室温に戻し、攪拌を2時間継続した。この混合物を飽和酒石酸NaK(400 ml)溶液に注ぎ、EtOAc(400 ml)で抽出した。EtOAc溶液を硫酸マグネシウムで乾燥後真空濃縮した。残さのTLC分析(n-ヘキサン：エーテル/3：7)によって、2つの化合物の混合物であることがわかり、一つのR_fは0.56、もう一つは0.39だった。これらの2つの化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに処した。n-ヘキサン：エーテル/3：1で溶出して、最初に非極性結晶異性体、404 mg(化合物(7)から21.4%)の(1'R)-異性体(n-ヘキサンから再結晶)を得、同じ溶媒でさらに溶出して、極性異性体、294 mg(化合物(7)から15.6%)のその(1'S)-異性体である、(4R, 1'S)-4-(1'-ヒドロキシ-7'-メチル-2', 6'-ヘキサデカジエニル)-2-フェニル-1, 3-オキサゾリン-2-エン異性体(13)を得た。この結晶性異性体が、エリトロ体である事は、後に最終生成物(4E, 8E)体に変換することによって確認した。

工程2：(4R, 1'S)-4-(1'-ヒドロキシ-7'-メチル-2', 6'-ヘキサデカジエニル)-2-フェニル-1, 3-オキサゾリン-2-エン(13)(160 mg, 0.4 mmol)のTHF溶液(4 ml)に2N-HCl(1 ml)を加えた。この混合物を室温にて20時間攪拌した。これを氷水(10 ml)で希釈し、CHCl₃-MeOH(87：13, 25 ml×3)で抽出した。有機溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、真空濃縮し、約200 mg(定量的)の化合物(14)を得た。

25 工程3： これをピリジン(1 ml)に溶かし、これにp-ニトロフェニル(S)-2-アセトキシヘキサデカノエート(400 mg, 0.92 mmol)のピリジン溶液(1 ml)を加え、45℃にて20時間攪拌した。溶媒を真空除去し、残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに処した。n-ヘキサン：エーテル/2：1で溶出し、黄色油を得、この少量のn-ヘキサン中の溶液は、(4E, 8

E, 2R, 3S, 2'S) -N-2'-アセトキシヘキサデカノイル-1-O-ベンゾイル-9-メチル-4, 8-オクタデカジエン-1, 3-ジオールの結晶を沈殿した。これをn-ヘキサンから再結晶して、184mgの純粋な生成物を得た。

- 5 この生成物(425mg, 0.6mmol)をCHCl₃(30ml)に溶解し、NaOHのMeOH溶液(0.3N, 20ml)に加え、混合物を室温にて15分攪拌した。これを氷冷した水(100ml)に注ぎ、CHCl₃(300ml×2)にて抽出した。このCHCl₃溶液を、洗浄(飽和食塩水)、乾燥(硫酸マグネシウム)し、真空濃縮してから、残さをシリカゲルカラムクロマトグラ
- 10 フィーに処した。CHCl₃-EtOAc(3:2)で溶出して固体を得、これをn-ヘキサンから再結晶して、248mg(73.4%)の(4E, 8E, 2R, 3S, 2'S) -N-2'-ヒドロキシヘキサデカノイル-9-メチル-4, 8-オクタデカジエン-1, 3-ジオール(15)を得た。

mp: 62.0-63.0°C, $[\alpha]^{23}_D$: -7.3 (c=0.61, CHCl₃)

- 15 実施例2 (4E, 8E, 2R, 3S, 2'S) -N-2'-ヒドロキシヘキサデカノイル-9-メチル-4, 8-オクタデカジエン-1, 3-ジオールの合成
- (1) 反応原料の調製

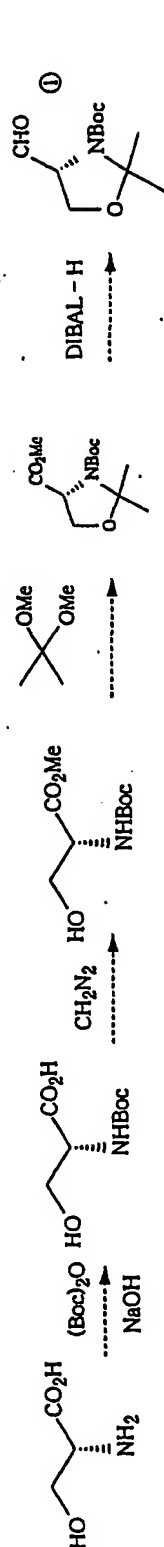
(A) N-Boc保護した(R)-ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成

- (R)-セリンより以下のスキームによって、N-Boc保護した(R)-2, 2-ジメチル-4-ホルミルオキサゾリジンを合成した。
- 20

(B) tert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)保護酸の合成

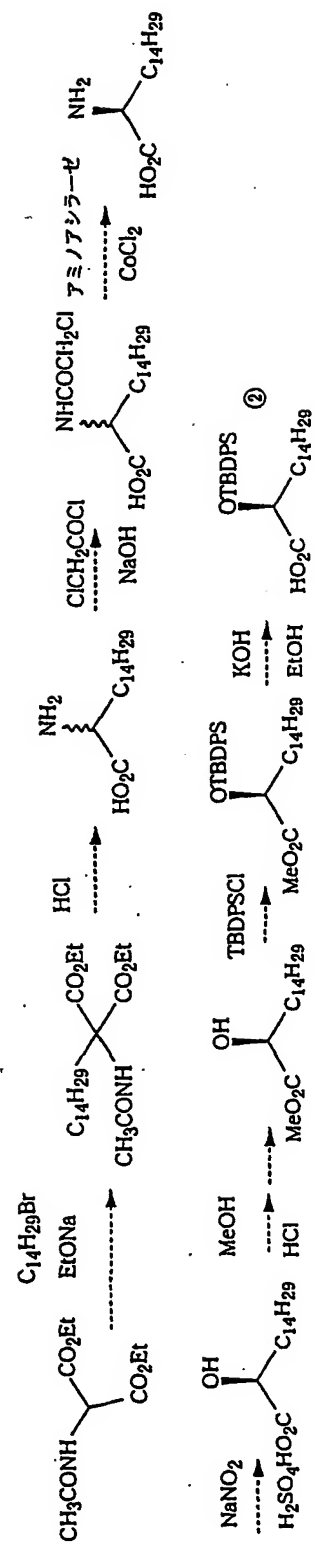
以下のスキームによって、(2S)-2-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)ヘキサデカン酸を合成した。

N-Boc 保護した (R) - ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成



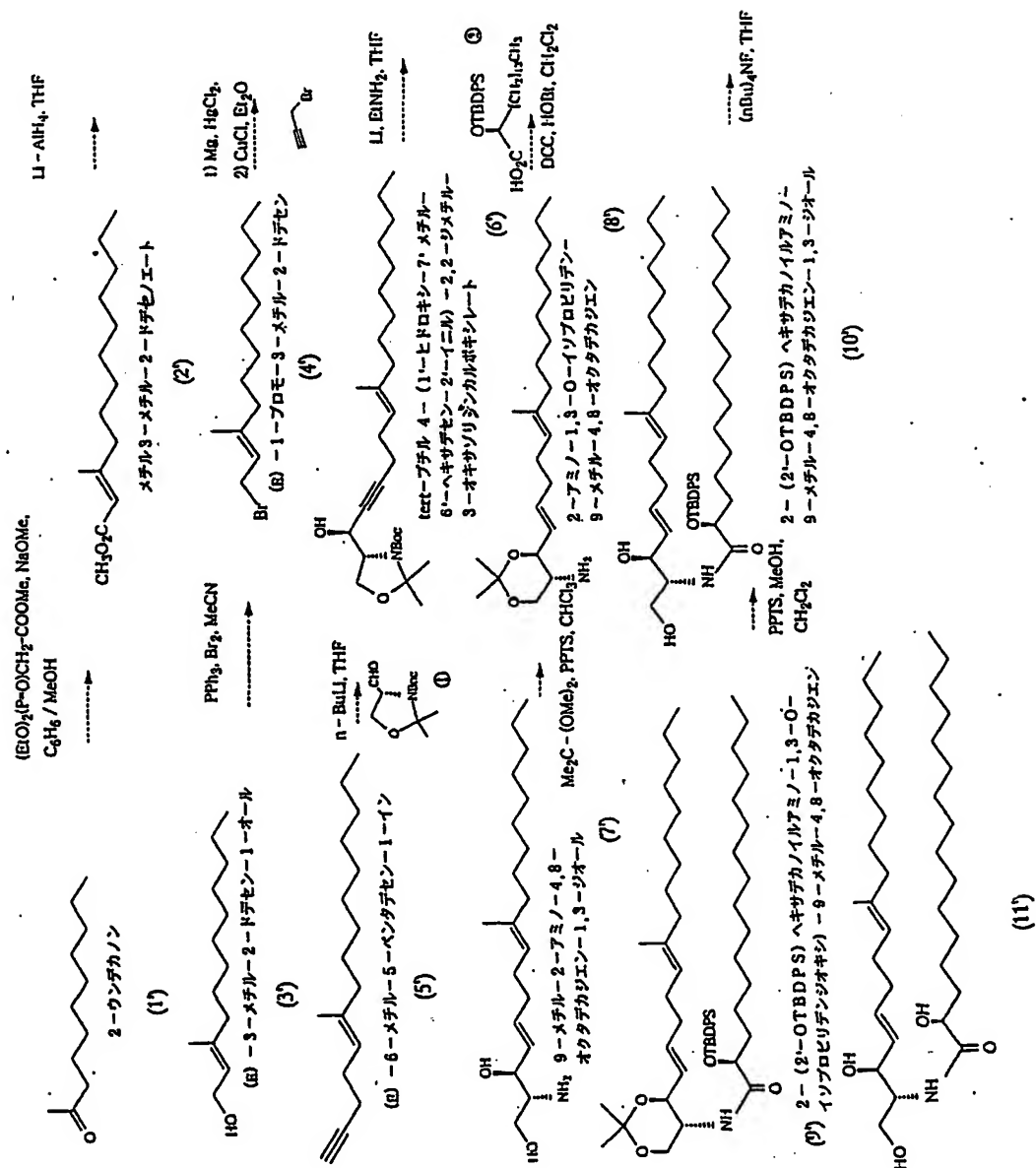
(R) - セリン

tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 保護酸の合成



(2) 出発物質及び実施例 2 の化合物の合成

合成スキームは、下記に示す。



(A) 出発物質の合成

- 2-ウンデカノン(メチルノニルケトン) (1') (73.9 g, 434 mmol) とメチル(ジエチルホスホノ)アセテート (99.4 g, 433 mmol) を乾燥ベンゼン (300 ml) 中に溶解した。溶液を室温にて攪拌し、メタノール中の28%ナトリウムメトキシド溶液 (83.7 g) をゆっくり加えた。攪拌を終夜、室温にて継続した。反応混合物を氷水に注ぎ、ジエチルエーテルにて抽出した。有機層を洗浄(水及び飽和食塩水)し、乾燥(硫酸ナトリウム)し、溶媒を真空除去し、メチル 3-メチル-2-ドデセノエート (2') の幾何異性体混合物を得た。
- 10 粗生成物、メチル 3-メチル-2-ドデセノエート (2') (E/Z混合物、98.5 g, 0.435 mol) の乾燥THF溶液 (150 ml) を、LiAlH₄ (16.5 g, 0.435 mol) の乾燥THF (300 ml) 攪拌懸濁液に室温で滴加した。反応混合物を還流しながら2時間加熱した。室温に戻した後、これに水と10%硫酸を続けてゆっくりと加え、この混合物をジエチルエーテルにて抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した
- 15 後真空濃縮し、粗(E)-3-メチル-2-ドデセン-1-オール (85.5 g, 99%) をE/Z混合物として得た。粗アルコール混合物のE/Z比は、250 MHz ¹H-NMR解析によって96:4であることが解った。この残さの一部(50 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン溶出)に処し、純
- 20 粋なE異性体 (3') 41.3 g (83%) を得た。
- トリフェニルホスフィン (18.6 g, 70.9 mmol) のアセトニトリル溶液 (100 ml) を0℃にて攪拌した。この溶液に、臭素 (11.4 g, 3.7 mmol, 71.3 mmol) をゆっくり混和した。この混合物に、(E)-3-メチル-2-ドデセン-1-オール (3') のアセトニトリル (30 ml) 溶液を滴
- 25 加し、0℃にて2時間攪拌した。溶媒を真空除去し、残さをジクロロメタンに溶解した。この溶液を飽和炭酸水素ナトリウム及び飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮した。ペンタンを残さに加え、生じた固体をろ過除去した。ろ液を真空濃縮し、17.9 g (97%) の(E)-1-ブromo-3-メチル-2-ドデセン (4') を得た。

臭化プロパルギル (22.4 g, 190 mmol) のジエチルエーテル溶液 (100 ml) をマグネシウム (5.20 g, 210 mmol) と HgCl_2 (360 mg, 1.33 mmol) に滴加し、臭化プロパルギルマグネシウム (グリニャール試薬) を得た。CuCl (200 mg, 2.02 mmol) をこのグリニャール試薬に加え、この溶液を氷冷した。(E)-1-ブromo-3-メチル-2-ドデセン (4') (18.8 g, 72.0 mmol) のジエチルエーテル (100 ml) 溶液を滴加した後、0℃にて3時間攪拌した。反応液を氷水に注ぎ、希塩酸で酸性にし、ジエチルエーテルを用いて数回抽出した。有機層を一緒にし、水及び飽和食塩水で洗浄した。少量のアレン型不純物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサンで溶出) によって除去し、純粋な (E)-6-メチル-5-ペンタデセン-1-イン (5') (12.7 g, 80%) を得た。

(B) 実施例2の化合物の合成

工程1: n-ブチルリチウムのn-ヘキサン溶液 (1.68 M, 10 ml, 16.8 mmol) を、上記(1)(B)で合成した (E)-6-メチル-5-ペンタデセン-1-イン (5') (4.0 g, 18.2 mmol) の乾燥THF (50 ml) 溶液に-23℃にて加え、その後同温度にて1時間アルゴンガス下で攪拌した。上記(1)(A)で合成したN-Boc保護した(R)-2,2-ジメチル-4-ホルミルオキサゾリジン (3.7 g, 16.1 mmol) の乾燥THF (30 ml) 溶液を、この攪拌混合物に-23℃にて混和し、その後、同温度にて3時間攪拌した。引き続き氷水に注ぎ、数回ジエチルエーテルで抽出した。一緒にした有機抽出物を洗浄 (水及び飽和食塩水) し、乾燥 (硫酸マグネシウム) し、これを真空濃縮して、得られる淡黄色油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: AcOEt = 20:1で溶出) によって精製し、5.17 g (11.5 mmol, 71%) のtert-ブチル (4R, 1'S)-4-(1'-ヒドロキシ-7'-メチル-6'-ヘキサデセン-2'-イニル)-2,2-ジメチル-3-オキサゾリジンカルボキシレート (6') を精製した。

工程2: tert-ブチル (4R, 1'S)-4-(1'-ヒドロキシ-7'-メチル-6'-ヘキサデセン-2'-イニル)-2,2-ジメチル-3-オキサゾリジンカルボキシレート (6') (8.4 g, 18.7 mmol) の乾燥TH

- F (100 ml) 溶液を、リチウム (2 g, 288 mmol) のエチルアミン (50 g) 青色溶液に1時間かけて、 -70°C にて攪拌しながら滴加した。4時間、 -70°C にて攪拌し、この混合物を徐々に周囲温度に戻し、飽和塩化アンモニウム溶液で処理した。エチルアミンと溶媒を真空除去し、残さに水を加えた。この
- 5 混合物をジエチルエーテルにて数回抽出した。一緒にした有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥させ、真空濃縮して、粗 (4E, 8E, 2R, 3S) - 9-メチル-2-アミノ-4, 8-オクタデカジエン-1, 3-ジオール (7') を4.5 g (14.4 mmol, 77%) の褐色油として得た。
- 工程3: 粗 (4E, 8E, 2R, 3S) - 9-メチル-2-アミノ-4, 8-オ
- 10 クタデカジエン-1, 3-ジオール (7') (4.3 g, 13.8 mmol) と、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS) (3.47 g, 13.8 mmol) と2, 2-ジメトキシプロパン (20 ml) とのトリクロロメタン (120 ml) 中混合物を4時間還流しながら加熱した。この混合物を室温に冷却し、トリクロロメタンで希釈した。これを洗浄 (飽和炭酸水素ナトリウム溶液、水、及
- 15 び飽和食塩水) 後、乾燥 (硫酸ナトリウム) し、真空濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィー ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=50:1$ で溶出) によって精製し、4.10 g の (4E, 8E, 2R, 3S) - 2-アミノ-1, 3-オ-イソプロピリデン-9-メチル-4, 8-オクタデカジエン (8') の淡褐色油 (6' 化合物に基づいて収率88%) を得た。 $n_D^{22}: 1.4751$, $[\alpha]^{24}_D = -8.78$ ($c=1.85$, CHCl_3)
- 20

- 上記 (1) (B) で合成した (2S) - 2- (tert-ブチルジフェニルシリルオキシ) ヘキサデカン酸 (2.20 g, 4.10 mmol) と、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 850 mg, 4.1 mmol) と、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (555 mg, 4.10 mmol) とを乾燥ジ
- 25 クロロメタン (40 ml) 中に溶解した。この溶液を室温にて攪拌しながら、(4E, 8E, 2R, 3S) - 2-アミノ-1, 3-オ-イソプロピリデン-9-メチル-4, 8-オクタデカジエン (8') (1.4 g, 4.1 mmol) の乾燥ジクロロメタン溶液 (20 ml) を滴加した。反応混合物を室温にて2時間攪拌後、量が半分となるまで真空濃縮し、生成した尿素をセライトろ過によって除去した。

ろ液を洗浄（飽和炭酸水素ナトリウム溶液、水及び飽和食塩水）し、乾燥（硫酸マグネシウム）し、真空濃縮し、残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって（ヘキサン：AcOEt／50：1で溶出）精製し、1.82g（51%）の（4E, 8E, 2R, 3S, 2'S）-2-[2'-(OTBDPS)ヘキサ
5 デカノイルアミノ]-1,3-O-(イソプロピリデンジオキシ)-9-メチル-4,8-オクタデカジエン（9'）を得た。

工程4：（4E, 8E, 2R, 3S, 2'S）-2-[2'-(OTBDPS)ヘキサデカノイルアミノ]-1,3-O-(イソプロピリデンジオキシ)-9-メチル-4,8-オクタデカジエン（9'）（1.1g, 1.26mmol）をC
10 H₂Cl₂/MeOH（1：1, 20ml）に溶解した。p-トルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS, 320mg）をこの溶液に加え、室温にて1時間攪拌し、溶媒を真空除去した。残さをAcOEtに溶解の後、この溶液を洗浄（飽和炭酸水素ナトリウム、水及び飽和食塩水）し、乾燥（硫酸マグネシウム）し、真空濃縮した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、（4E,
15 8E, 2R, 3S, 2'S）-2-[2'-(OTBDPS)ヘキサデカノイルアミノ]-9-メチル-4,8-オクタデカジエン-1,3-ジオール（10'）（680mg, 65%）を得た。

TBDPSエーテル、（4E, 8E, 2R, 3S, 2'S）-2-[2'-(OTBDPS)ヘキサデカノイルアミノ]-9-メチル-4,8-オクタデカジ
20 ン-1,3-ジオール（10'）（640mg, 0.71mmol）をTHF（50ml）に溶解し、テトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド（1M THF溶液、1.2ml, 1.2mmol）をこの溶液に加え、1時間室温にて攪拌した。これを水に注ぎ、ジクロロメタンにて抽出した。有機層を水及び飽和食塩水にて洗浄後、硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、真空濃縮した。残さをシリカゲ
25 ルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/AcOEt, 1：1で溶出）で精製し、アセトンから再結晶して、（4E, 8E, 2R, 3S, 2'S）-N-2'-ヒドロキシヘキサデカノイル-9-メチル-4,8-オクタデカジエン-1,3-ジオール（11'）（424mg, 93%）を得た。

mp：82.0℃、 $[\alpha]^{24}_D$ ：+8.2（c=1.0、CHCl₃）

実施例3 (4E, 2S, 3R, 2'RS) -N-2'-ヒドロキシヘキサデカノ
イル-9-メチル-4-オクタデセン-1, 3-ジオールの合成

(1) 反応原料の調製

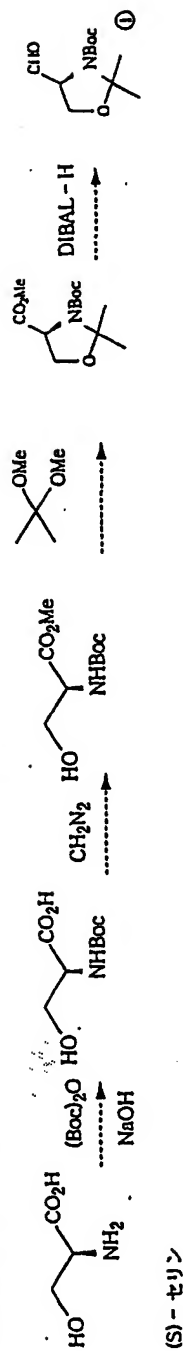
(A) N-Boc保護した(S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成

- 5 (S)-セリンより以下のスキームのように、N-Boc保護した(S)-2,
2-ジメチル-4-ホルミルオキサゾリジンを合成した。

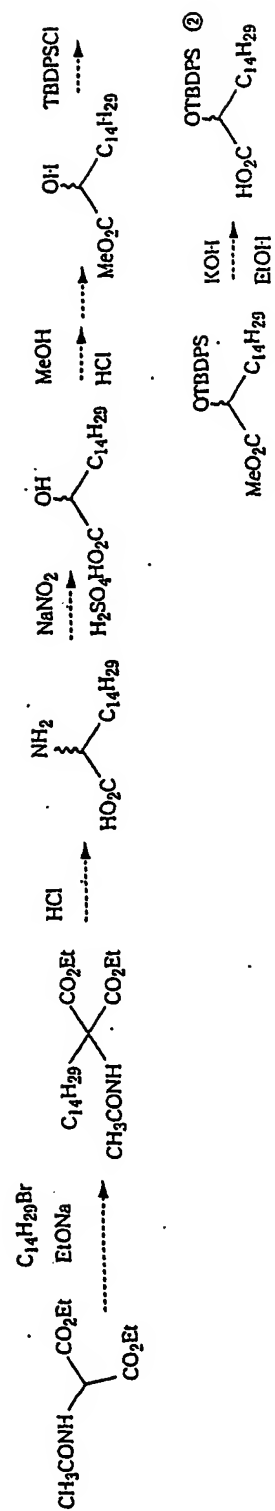
(B) tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 保護酸の合成

以下のスキームのように、(2RS)-2-(tert-ブチルジフェニルシリ
ルオキシ)ヘキサデカン酸を合成した。

N-Boc 保護した (S) -ホルミルオキサゾリジン誘導体の合成

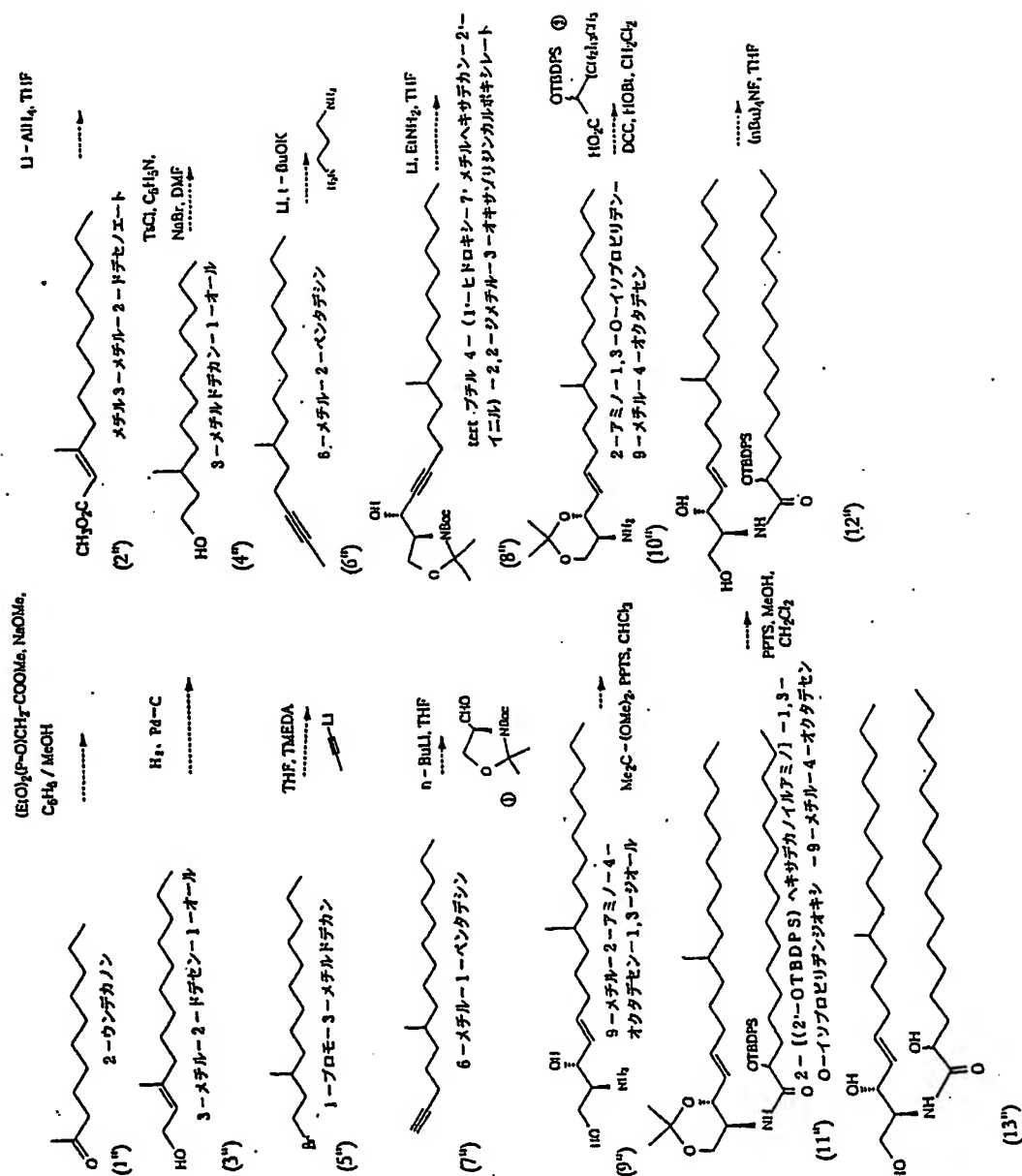


tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 保護酸の合成



(2) 実施例 3 の合成

合成スキームは、下記に示す。



工程1: 2-ウンデカノン(1")から実施例2と同様にして得た、3-メチル-2-ドデセン-1-オール(3") (30 g, 0.15 mol) の酢酸エチル溶液(300 ml)にPd-C(1.0 g)を加え、水素雰囲気下3日間攪拌した。反応液をセライトろ過し、得られたろ液を濃縮後、減圧蒸留することによって3-メチルドデカン-1-オール(4") (20 g, 67%)を得た。b. p. 122~123℃/4トル。¹H-NMR(90 MHz, CDCl₃) 0.8-1.0(6H, m, Me), 1.0-1.7(20H, m, 2~11-H及びOH)、3.66(2H, q, J=7, 1-H)。

工程2: 3-メチルドデカン-1-オール(4'') (12.8 g, 63.9 mmol) の塩化メチレン(50 ml)溶液にピリジン(20 ml)を加え、さらに塩化パラトルエンスルホン(12.8 g, 67.1 mmol)を氷冷下加えた。反応液を4℃にて終夜攪拌した後、希塩酸に注ぎ、ヘキサン抽出した。有機層を洗浄(水、飽和重曹水、飽和食塩水)し、乾燥(硫酸マグネシウム)した。これを減圧濃縮し、21.7 gのトシラートを得た。得られたトシラートのDMF溶液(100 ml)に、臭化ナトリウム(9.9 g, 96 mmol)を加え、室温にて終夜攪拌した。反応液を水に注ぎ、ヘキサン抽出した。有機層を洗浄(水及び飽和食塩水)し、乾燥(硫酸マグネシウム)し、減圧濃縮し、1-ブロモ-3-メチルドデカン(5") (15.1 g, 90%)を得た。¹H-NMR(90 MHz, CDCl₃) 0.8-1.0(6H, m, Me), 1.0-2.0(19H, m, 2~11-H)、3.43(2H, br t, J=7, 1-H)。

工程3: プロピン(約4 g, 0.1 mol)のTHF(80 ml)溶液にアルゴン下、テトラメチルエチレンジアミン(TMEDA)(15 ml)を加えた。そこに、n-BuLi(1.55 M, 64.5 ml, 100 mmol)を-78℃にて滴加した。徐々に0℃まで昇温しながら1.5時間攪拌した後、-78℃まで再び冷却した。そこへ1-ブロモ-3-メチルドデカン(5") (13.2 g, 50 mmol)のHMPA-THF(20 ml+20 ml)溶液を滴加し、徐々に室温まで昇温しながら終夜攪拌を続けた。反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液に注ぎヘキサン抽出し、得られた有機層を洗浄(水、飽和重曹水、飽和食塩水)し、乾燥(硫酸マグネシウム)し、これを減圧濃縮して得られる残さをシリカゲ

ルカラムクロマトグラフィーによって精製し、6-メチル-2-ペンタデシン
(6'') (12.1 g, 97%) を得た。¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃)
0.84 (3H, d, J=7, 6-Me), 0.88 (3H, t, J=7, 15-H),
1.0-1.6 (19H, m, 5~14-H), 1.77 (3H, t, J=2.5, 1-H), 2.12 (2H, m, 4-H)。
5

工程4: 蒸留した無水1,3-ジアミノプロパン (180 ml) にアルゴン気
流下金属リチウム (2.8 g, 0.4 mmol) を加え、70℃にて2時間攪拌し
た。放冷後、カリウムt-ブトキシド (27 g, 0.24 mmol) を加え、さら
に15分間攪拌した。そこに6-メチル-2-ペンタデシン (6'') (12.1 g,
10 54.5 mmol) を滴加し、室温にて終夜攪拌した。この反応を飽和塩化アン
モニウム水溶液にて注意深くクエンチした後、混合物をエーテル抽出した。得ら
れた有機層を洗浄 (希塩酸、飽和重曹水及び飽和食塩水) し、乾燥 (硫酸マグネ
シウム) した。これを減圧濃縮して得られる残さをシリカゲルカラムクロマトグ
ラフィーによって精製し、6-メチル-1-ペンタデシン (7'') (9.90 g,
15 82%) を得た。これは、IR 或いは¹H-NMR によって分析した結果、IR
(film) 3300 (m, C≡CH), 2130 cm⁻¹ (w, C≡C)。¹H-
NMR (90 MHz, CDCl₃) 0.84 (3H, d, J=7, 6-Me), 0.
88 (3H, t, J=7, 15-H), 1.0-1.6 (21H, m, 4~14-H), 1.93 (1H, t, J=2.5, 1-H), 2.0-2.3 (2H, m,
20 3-H) となった。

工程5: n-ブチルリチウムのn-ヘキサン溶液 (1.68 M, 10 ml, 1
6.8 mmol) を6-メチル-1-ペンタデシン (7'') (4.0 g, 18.2
mmol) の乾燥THF溶液に-23℃にて加え、その後同温度にて1時間アル
ゴンガス下で攪拌した。上記(1)(A)で得たN-Boc保護した(S)-2,
25 2-ジメチル-4-ホルミルオキサゾリジン (3.7 g, 16.1 mmol) の
乾燥THF (30 ml) 溶液を、この攪拌混合物に-23℃にて混和し、その後、
同温度にて3時間攪拌した。引き続き氷水に注ぎ、数回ジエチルエーテルで抽出
した。得られた有機抽出物を洗浄 (水及び飽和食塩水) し、乾燥 (硫酸マグネシ
ウム) した。これを真空濃縮して得られる淡黄色油状物をシリカゲルカラムクロ

- マトグラフィー（ヘキサン：AcOEt=20：1で溶出）によって精製して、
5.17 g (11.5 mmol, 71%) の *tert*-ブチル (4S, 1'R) -4-(1'-ヒドロキシ-7'-メチルヘキサデカン-2'-イニル) -2, 2-ジメチル-3-オキサゾリジンカルボキシレート (8'') を精製した。
- 5 工程6: *tert*-ブチル (4S, 1'R) -4-(1'-ヒドロキシ-7'-メチルヘキサデカン-2'-イニル) -2, 2-ジメチル-3-オキサゾリジンカルボキシレート (8'') (8.4 g, 18.7 mmol) の乾燥THF (100 ml) 溶液を、リチウム (2 g, 288 mmol) のエチルアミン (50 g) 青色溶液に1時間かけて、-70℃にて攪拌しながら滴加した。4時間、-70℃
10 にて攪拌し、この混合物を徐々に周囲温度に戻し、飽和塩化アンモニウム溶液で処理した。エチルアミンと溶媒を真空除去し、残さに水を加えた。この混合物をジエチルエーテルにて数回抽出した。一緒にした有機抽出物を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥させ、真空濃縮して、粗 (4E, 2S, 3R) -9-メチル-2-アミノ-4-オクタデセン-1, 3-ジオール (9'') を4.5
15 g (14.4 mmol, 77%) の褐色油として得た。
- 工程7: 粗 (4E, 2S, 3R) -9-メチル-2-アミノ-4-オクタデセン-1, 3-ジオール (9'') (4.3 g, 13.8 mmol) と、p-トルエン
スルホン酸ピリジニウム (PPTS) (3.47 g, 13.8 mmol) と、2, 2-ジメトキシプロパン (20 ml) とのトリクロロメタン (120 ml) 中混
20 合物を4時間還流しながら加熱した。この混合物を室温に冷却し、トリクロロメタンで希釈した。これを洗浄（飽和炭酸水素ナトリウム溶液、水、及び飽和食塩水）後、乾燥（硫酸ナトリウム）し、真空濃縮した。残さをシリカゲルクロマト
グラフィー (CH₂Cl₂:MeOH=50:1) によって精製し、4.10 g の
(4E, 2S, 3R) -2-アミノ-1, 3-オ-イソプロピリデン-9-メチ
25 ル-4-オクタデセン (10'') の淡褐色油 (8'' 化合物に基づいて収率88%) を得た。

上記 (1) (B) で得た (2RS) -2-(*tert*-ブチルジフェニルシリルオキシ) ヘキサデカン酸 (2.20 g, 4.10 mmol) と、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 850 mg, 4.1 mmol) と、1-ヒドロキシ

ベンゾトリアゾール (HOBt) (5.55 mg, 4.10 mmol) とを乾燥ジクロロメタン (40 ml) 中に溶解した。この溶液を室温にて攪拌しながら、(4E, 2S, 3R) - 2-アミノ-1, 3-オ-イソプロピリデン-9-メチル-4-オクタデセン (10") (1.4 g, 4.1 mmol) の乾燥ジクロロメタン溶液 (20 ml) を滴加した。反応混合物を室温にて2時間攪拌後、量が半分となるまで真空濃縮し、生成した尿素をセライトろ過によって除去した。ろ液を洗浄 (飽和炭酸水素ナトリウム溶液、水、及び飽和食塩水)、乾燥 (硫酸マグネシウム) し、真空濃縮し、残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって (ヘキサン: AcOEt / 50 : 1 で溶出) 精製し、1.82 g (51%) の (4E, 2S, 3R, 2' RS) - 2- [2' - (OTBDPS) ヘキサデカノイルアミノ] - 1, 3-オ- (イソプロピリデンジオキシ) - 9-メチル-4-オクタデセン (11") を得た。

工程8: (4E, 2S, 3R, 2' RS) - 2- [2' - (OTBDPS) ヘキサデカノイルアミノ] - 1, 3-オ- (イソプロピリデンジオキシ) - 9-メチル-4-オクタデセン (11") (1.1 g, 1.26 mmol) を CH_2Cl_2 / MeOH (1 : 1, 20 ml) に溶解した。p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS, 320 mg) をこの溶液に加え、室温にて1時間攪拌し、溶媒を真空除去した。残さをAcOEtに溶解の後、溶液を洗浄 (飽和炭酸水素ナトリウム、水及び飽和食塩水) し、乾燥 (硫酸マグネシウム) し、真空濃縮した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、(4E, 2S, 3R, 2' RS) - 2- [2' - (OTBDPS) ヘキサデカノイルアミノ] - 9-メチル-4-オクタデセン-1, 3-ジオール (12") (680 mg, 65%) を得た。

TBDPSEーテル、(4E, 2S, 3R, 2' RS) - 2- [2' - (OTBDPS) ヘキサデカノイルアミノ] - 9-メチル-4-オクタデセン-1, 3-ジオール (640 mg, 0.71 mmol) を THF (50 ml) に溶解し、テトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド (1M THF溶液、1.2 ml, 1.2 mmol) をこの溶液に加え、1時間室温にて攪拌した。これを水に注ぎ、ジクロロメタンにて抽出した。有機層を洗浄 (水及び飽和食塩水) 後、乾燥 (硫酸

マグネシウム) し、真空濃縮した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/AcOEt, 1:1) で精製し、アセトンから再結晶して、(4E, 2S, 3R, 2' RS) -N-2'-ヒドロキシヘキサデカノイル-9-メチル-4-オクタデセン-1, 3-ジオール (13") (400mg, 89%) を得た。

5 mp: 52-57°C, $[\alpha]^{20}_D$: +3.7 ($c=0.06$, CHCl₃)

実施例4 Edg受容体応答性試験

HL60細胞を細胞銀行より入手し、BBRC' 98, 263, p. 253記載の方法に従って、10%ウシ胎児血清を含有したRPMI-1640培地 (Gibco) を用いて半年間50継代前後培養し、Edg受容体を細胞表面に発現している前骨髄芽腫細胞株HL60を調製した。このEdg受容体を細胞表面に発現している前骨髄芽腫細胞株HL60を用いて、被験物質の細胞応答性を検討した。細胞応答の指標として、細胞内Ca²⁺濃度の上昇を測定した。なお、HL60細胞表面上のEdg受容体は、AHOPと結合すると、Gタンパク質をリン酸化し、IP₃キナーゼを活性化した後に細胞内Ca²⁺濃度が上昇することが報告されている (FEBS Letter' 96, 379, p. 260, BBRC' 98, 253, p. 253) ので、細胞内Ca²⁺濃度がEdg受容体応答性の指標となる。

Ca²⁺キレート試薬Fura-2AMをHL60細胞に取り込ませた。

石英製セル内に細胞懸濁液1.2mlを充填し蛍光光度計LS50B (Perkin Elmer、細胞測定用) に装着し、0.5秒毎に励起波長を340nm (Ca²⁺をキレートしたFura-2を励起) と380nm (未反応Fura-2を励起) に交互に切り替え510nmの蛍光光度を測定した。

被験物質をそれぞれ30μM終濃度で、マイクロシリンジを用いて加えた後蛍光光度を追跡してCa²⁺が増加するかどうか検討した。また、被験物質添加後にAHOP (1μM) を追加した際、Ca²⁺が増加するかどうか確認し、各物質のAHOP拮抗性について検討した。

実施例2の化合物、或いは実施例3の化合物を添加した後、AHOP追加による細胞内Ca²⁺濃度増加が阻止された事より、これら二物質がEdg拮抗性である可能性が示唆された。

次に、拮抗の可能性が示唆された二物質、すなわち実施例 2 の化合物及び実施例 3 の化合物による細胞内 Ca^{2+} 増加阻止作用の用量依存性を検討した。比較として、既に、拮抗作用が確認されているスラミンを用いた。実験手法は、各濃度の被験物質添加後 AHOP (1 μM) を添加した以外は上記と同様に行った。また、 Ca^{2+} 濃度増加は、陰性対照群 (薬剤無添加) での Ca^{2+} 増加濃度に対する相対値として、 Ca^{2+} 増加濃度 % で評価した。

その結果、実施例 3 の化合物が、0.3 ~ 3 μM 濃度において、実施例 2 の化合物が 0.03 ~ 0.3 μM 濃度において、用量依存的に AHOP による Ca^{2+} 濃度増加を抑制した。その結果を図 1 に示す。

また、細胞内 Ca^{2+} 濃度増加の 50% 阻止濃度 (ED_{50}) は、実施例 3 の化合物で、 $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 、実施例 2 の化合物で、 $0.041 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であった。既に Edg 拮抗性が報告されているスラミンの ED_{50} 値が $1.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であるのと比較すると実施例 2 の化合物の作用強度はおよそ 40 倍強いことになる。これらの ED_{50} 値を表 1 に示す。

表 1

Ca^{2+} 増加の 50% 阻止点

物質	ED_{50} (μM)
陽性対照 スラミン	1.8 ± 0.1
被験物質 実施例 2	0.041 ± 0.1
実施例 3	1.2 ± 0.1

実施例 5 ^3H -AHOP を用いた競合実験

実施例 4 と同じ Edg 受容体を細胞表面に発現している前骨髄芽腫細胞株 HL 60 を用いた。細胞を遠心分離によって回収後 F-12 培地 (4℃ 保存、10 ml) に懸濁し、RI 実験室に搬入した。細胞懸濁液 200 μl (1×10^6 細胞 / ml F-12) に、終濃度 1 nM の ^3H -AHOP ($15 \mu\text{Ci} / 1 \text{nM}$) と終濃度 10 nM、30 nM 又は 100 nM の非標識化合物 (実施例 2 または実施例 3 の化合物) を加え、4℃ にて 30 分間 (時々攪拌して) 結合試験を行った。

7分間12,000rpmにて遠心分離後、上澄を素早く（細胞ペレットを傷付けない様に）マイクロピペッターで捨て去り、細胞ペレットをレディソルブ（ベックマン）1.5mlで懸濁後バイアルに移し液体シンチレーションカウンターL2100（ベックマン）で放射活性を測定した。

- 5 その結果、AHOPと同様、実施例2及び実施例3の化合物が、 ^3H -AHOPに競合した事より、これら二物質がEdgと特異的に結合していると考えられた。

- 10 なお、実施例2の化合物、及び実施例3の化合物の添加を1nM、3nM、及び10nMで行う以外は上記と同様な競合実験に供したところ、用量依存的な ^3H -AHOPの（HL60細胞への）結合阻止を観察した。その結果を図2に示す。

実施例6 血管平滑筋に及ぼす作用

被験物質について血管平滑筋増殖への作用を検討した。

- 15 動脈硬化症の進行に伴って血管平滑筋細胞が収縮型から合成型に形質転換し、炎症性サイトカインを分泌しながら血管平滑筋細胞が増殖し動脈硬化巣が進展すると考えられている（ロスの仮説）。血管平滑筋細胞の表面にはEdg受容体が発現している事が報告されており（The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics' 00, Vol. 58, 449頁、AHOPと同様、Edg受容体に作動するスフィンゴシルフォスホリルコリンに応答して血管平滑筋細胞が増殖する事が報じられている（The American Physiological Society' 98, C1255頁））。

- 25 従って、実施例2及び実施例3の化合物による血管平滑筋増殖への作用を以下のように測定した。陽性対照として、Edg受容体拮抗性が確認されているスラミンを用いた。

ラット頸動脈内膜をバルーニングによって擦過し、2週間後にエキスプラント法(explant culture)によって調製した血管平滑筋細胞を10%ウシ胎児血清を含んだDMEM培地(Gibco)にて培養し、数回継代し安定させた後、 5×10^3 細胞/cm²の細胞密度に蒔種し実験に用いた。

増殖因子スフィンゴシルフォスフォリルコリン ($10 \mu\text{M}$) と併せて実施例 2、実施例 3 の化合物或いはスラミンを上記細胞に添加し、24 時間後、BrdU アッセイ (Science' 82, 218, p. 474, Cytometry' 85, 6, p. 584) によって細胞密度を測定した。

- 5 その結果、実施例 2 及び実施例 3 の化合物はそれぞれ $0.3 \sim 3 \mu\text{M}$ 濃度及び $1 \sim 10 \mu\text{M}$ 濃度において、用量依存的に血管平滑筋細胞増殖を抑制した。なお、陽性対照として用いたスラミンについては 30 、 $100 \mu\text{M}$ 濃度において血管平滑筋細胞増殖を抑制した。その結果を図 3 に示す。

実施例 7 疑似血管モデルを用いた抗炎症試験

- 10 体内の損傷部位で、露出を受けたコラーゲン (細胞外マトリックス) が損傷シグナルとして標的になり、血小板が凝集してくるが、凝集して活性化した血小板から放出される PDGF などの炎症性サイトカインは、炎症を進行させ、また重度の炎症は循環器の恒常性を破綻させ、動脈硬化を進行させると考えられている。

AHOP も、PDGF と同様の作用を有すると考えられている。

- 15 そこで、AHOP を炎症惹起剤として用いて、疑似血管 in vitro モデルを確立して、そのモデルを用いて、本発明化合物が抗炎症作用を示し、それによって、循環器の恒常性を維持し、病態を改善する方向に作用する可能性があるか否かを検討した。

(1) 疑似血管モデルを用いた AHOP の炎症惹起作用

- 20 多孔膜により上室と下室とに区切られたトランスウェルを用い、トランスウェル上室底面の孔膜上に一層のウシ内皮細胞を培養し、トランスウェル上室に蛍光標識した好中球浮遊液を加え、下室に AHOP を終濃度 $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ となるように懸濁した。即ち、トランスウェルの上室と下室は内皮層を隔てて隔離され、上室が血管内部、下室が血管外の炎症部に対応する疑似血管 in vitro 炎症モデルと
- 25 なっている。上室から内皮層を潜り抜けて下室へ透過した好中球数、及び、内皮層に粘着した好中球数を測定したところ、AHOP $10 \mu\text{M}$ にて、有意に好中球の内皮層透過、及び、粘着が促進を受けた。つまり、AHOP が炎症惹起物質として作用していると考えられた。

(2) 炎症細胞－血管内皮細胞相互作用に及ぼす本発明化合物 (Edg 拮抗物質)

の作用

AHOPを炎症惹起物質として用い、Edg拮抗性を示す実施例2、3の化合物が疑似血管 in vitro 炎症モデルに及ぼす影響を検討した。

即ち、トランスウェル上室或いは下室に実施例2または3の化合物を0.01~1
5 microMで添加し、AHOP 10 microMを下室に入れて炎症を惹起した。コントロールは、薬剤無添加で上記と同様に炎症を惹起したものをを用いた。

上室から内皮層を抜け下室へ透過した好中球数及び内皮層に粘着した好中球数を測定し、相対的好中球数%を以下の式により算出した。

相対的好中球数% = [実験群での好中球(透過及び粘着)数] / [コントロールでの
10 好中球(透過及び粘着)数] x 100

その結果を図4に示す。図に示されるように、実施例2及び3の化合物の0.1、1 microMにて、好中球透過及び粘着が抑制を受けた。

従って、疑似血管 in vitro モデルにおいて、AHOPを炎症惹起剤として用いた場合、実施例2、3の化合物は抗炎症的に作用する事より、循環器の恒常性を維
15 持し、病態を改善する方向に作用する可能性が考えられる。

実施例8 結紮による心筋梗塞モデル

実施例2の化合物を被験物質とし、ウサギ冠動脈結紮再灌流による心筋梗塞に及ぼす影響を検討した。

ウサギは、NZW系雄性(体重2.83-3.20 kg)を北山ラベス社より
20 購入し、室温20-26℃、湿度40-70%、照明時間12時間/日(7-19時)の条件下で飼育し、飼料及び水を自由に摂取させ、2週間以上の検疫および馴化飼育した後、健康状態の良好なものをを用いた。

上記ウサギを麻酔下、実施例2の化合物10 mg/kg量を頸部静脈内投与し、その後実施例2の化合物6.9 micro g/kg/分量を持続投与した。コントロールとして
25 生理食塩水(以下、生食と略する)を実験群と同様に投与した。次に、冠動脈を30分間結紮した後糸を解いて再灌流し、頸動脈内血圧、脈拍及び不整脈数を測定した。頸動脈内血圧及び脈拍は、投与前、持続静注中、結紮期間(15分後及び30分後)、或いは再灌流中に各々測定した。頸動脈内血圧は、平均血圧として算出した。不整脈数は、結紮期間(30分間)或いは再灌流の期間に出現した期

外収縮数を測定した。それらの結果を下記の表 2 及び 3 に示す。

再灌流 3 時間後に心臓を摘出し、6 切片に薄切し、2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム塩酸塩 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium hydrochloride (TTC)) で生きている組織を染色し、結紮による梗塞領域の面積を測定し、左心室の面積当たりの梗塞領域率を算出した。その結果を下記の表 4 に示す。

表 2

血圧、及び脈拍に及ぼす実施例 2 の化合物の影響

項 目	薬 剤	動物数	投与前	持 続 静 注	結 紮 (分)		再灌流(分)
					15	30	
平均血圧 (mmHg)	生 食	4	74±3	75±4	54± 8	64± 4	68± 3
	実施例 2	4	83±4	74±9	59±10	66± 8	68± 4
脈 拍 (回 / 分)	生 食	4	299±12	293±10	255±24	269±18	269±14
	実施例 2	4	301± 9	283±10	270± 9	282± 4	256±10

表 3

不整脈数に及ぼす実施例 2 の化合物の影響

薬 剤	動物数	結 紮	再 灌 流
生 食	4	22±10	19±12
実施例 2	4	12± 5	17± 6

表 4

梗塞領域率に及ぼす実施例 2 の化合物の影響

薬 剤	動物数	梗塞領域/左心室 (%)
生 食	4	17.9±2.4
実施例 2	4	14.0±2.1

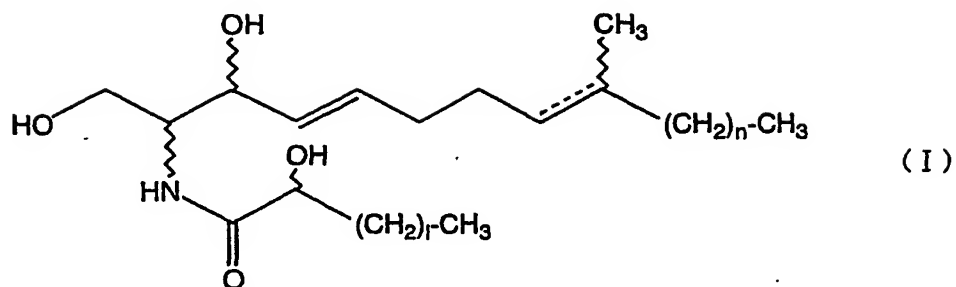
その結果、実施例 2 の化合物はウサギ急性心筋梗塞モデルにおいて、結紮による脈拍低下を抑え、不整脈数を減少させる傾向を示した。また、実施例 2 の化合物は梗塞領域率を減少する傾向を示した。

産業上の利用可能性

- 5 本発明の化合物は、優れた E d g 受容体拮抗作用を示し、本発明の化合物を有効成分とする医薬は循環器系疾患（例えば、動脈硬化症、心臓疾患）、がん、リウマチ、糖尿病性網膜症、呼吸器系疾患に対して優れた治療効果を示す。

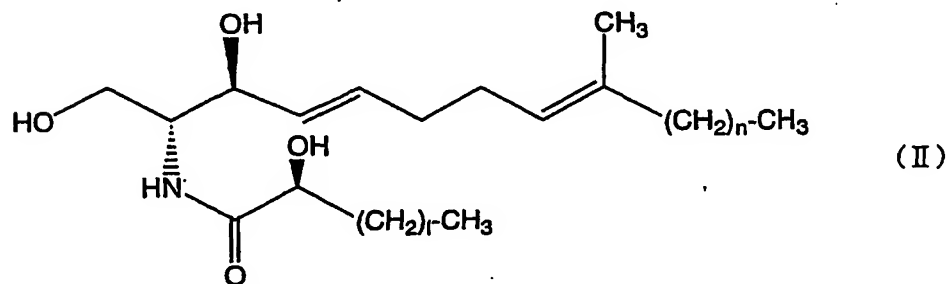
請求の範囲

1. 式 (I)

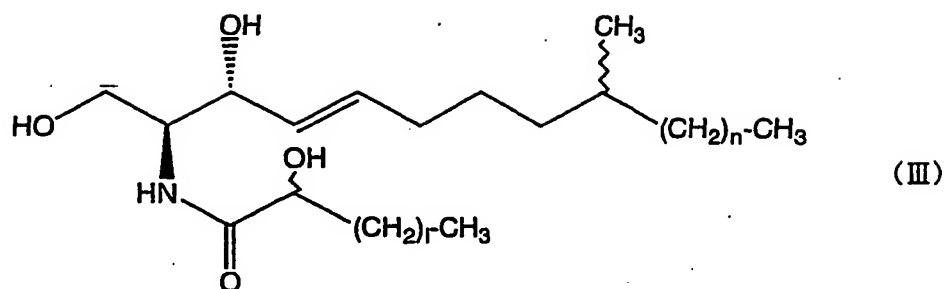


5

- (式中、nは1～11の整数であり、lは1～16の整数である)
 で表される脂肪族化合物であって、8位が二重結合である場合には、(2R、3S、
 2'S)の光学異性体であり、また8位が単結合である場合には、(2S、3R、
 10 2'R S)の光学異性体である化合物またはその薬理学的に許容される塩。
 2. 式 (I) の化合物が式 (II)

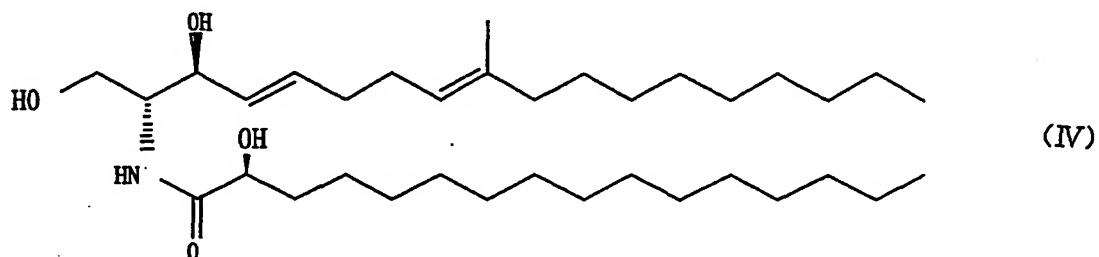


- 15 (式中 l 及び n は請求の範囲第 1 項の記号の字義と同一である) で表される化合物である請求の範囲第 1 項の化合物またはその薬理学的に許容される塩。
 3. 式 (I) の化合物が式 (III)



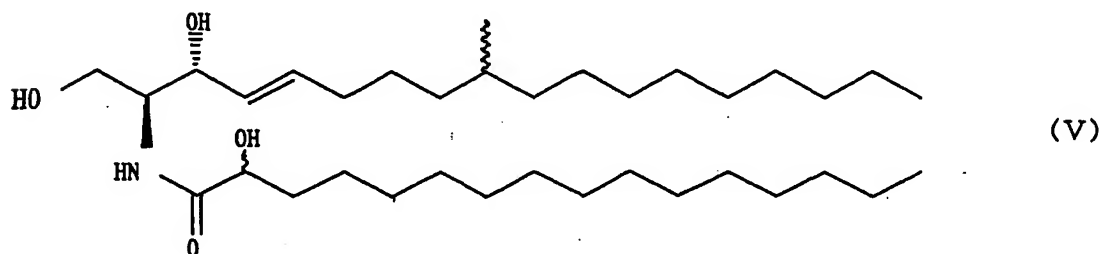
(式中 l 及び n は請求の範囲第 1 項の記号の字義と同一である) で表される化合物である請求の範囲第 1 項の化合物またはその薬理学的に許容される塩。

5 4. 式 (I) の化合物が式 (IV)



で表される化合物である、請求の範囲第 1 項の化合物またはその薬理学的に許容される塩。

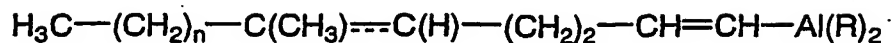
10 5. 式 (I) の化合物が式 (V)



で表される化合物である請求の範囲第 1 項の化合物またはその薬理学的に許容される塩。

6.

(1) 下記式の (E) 体のアルケニルアラン:



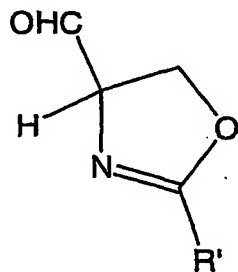
5

(式中 n は請求の範囲第 1 項の記号の字義と同一であり、R はアルキル基である)

と

下記式のオキサゾリンアルデヒド誘導体であって、目的化合物の 2 位と同じ光学異性を有するもの:

10



(式中 R' はアルキル基またはアリール基である)

とを反応させること、

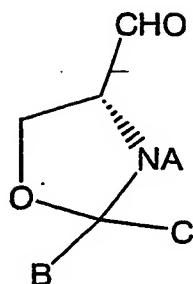
- 15 (2) 第 (1) 工程生成物のオキサゾリンを開環して、 NH_2 基及び $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}'$ 基を有する化合物を得ること、

(3) 第 (2) 工程生成物を、目的化合物の 2' 位と同じ光学異性を有するアシル化剤によって N-アシル化し、次に、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}'$ 基を脱離させることによる、請求の範囲第 1 項の式 (I) 化合物の製造方法。

20 7.

(1) (E) 体の $\text{HC}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$
(n は請求の範囲第 2 項と同じ字義を表す) と

下記式の N-保護された (R)-ホルミルオキサゾリジン誘導体:

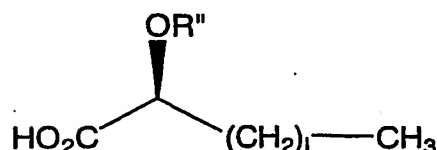


(式中AはNの保護基であり、B及びCはアルキル基である)
とを反応させること、

- 5 (2) 第(1)工程生成物の三重結合を(E)型二重結合にし、同時に、オキサゾリジンを開環しながら脱保護して、 NH_2 基及びOH基を有する化合物を得ること、

(3) 第(2)工程生成物の水酸基を保護し、この保護した化合物と、
下記式の化合物：

10



(式中、 R'' はOHの保護基であり、 l は請求の範囲第2項と同じ字義を表す)
とを反応させること、

- 15 (4) 水酸基を脱保護し、 R'' 基を脱離させること、を含む請求の範囲第2項の化合物の製造方法。

8.

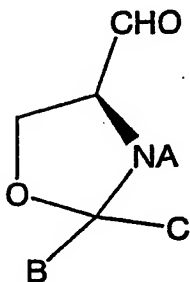
(1) $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ (n は請求の範囲第3項と同じ字義を表す)の不飽和部分を接触還元によって飽和すること、

- 20 (2) 第(1)工程生成物の水酸基を臭素で置換すること、

(3) 第(2)工程生成物の臭素を $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-$ で置換すること、

(4) 第(3)工程生成物の三重結合の位置を末端に移動させて、末端三重結合化合物を得ること、

(5) 末端三重結合化合物に、下記式のN-保護された(S)-ホルミルオキサゾリジン誘導体：



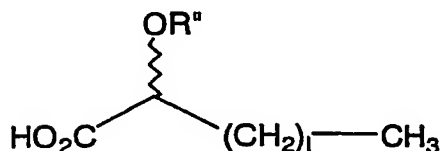
5

(式中AはNの保護基であり、B及びCはアルキル基である)
を反応させること、

(6) 第(5)工程生成物の三重結合を(E)型二重結合にし、同時に、オキサゾリジンを開環しながら脱保護して、NH₂基及びOH基を有する化合物を得ること、

10

(7) 第(6)工程生成物の水酸基を保護し、この保護した化合物と、
下記式の化合物：



15

(式中、R'' はOHの保護基であり、1は請求の範囲第3項と同じ字義を表す)
とを反応させること、

(8) 水酸基の保護基を脱保護し、R''基を脱離させること、を含む請求の範囲第3項の化合物の製造方法。

20

9. 請求の範囲第1項～請求の範囲第5項のいずれか1項に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、内皮分化遺伝子(Edg)受容体に拮抗する医薬。

10. 循環器系疾患を治療するための請求の範囲第9項の医薬。

- 1 1. 循環器系疾患が動脈硬化症である請求の範囲第 1 0 項の医薬。
- 1 2. がんを治療するための請求の範囲第 9 項の医薬。
- 1 3. リウマチを治療するための請求の範囲第 9 項の医薬。
- 1 4. 糖尿病性網膜症を治療するための請求の範囲第 9 項の医薬。
- 5 1 5. 呼吸器系疾患を治療するための請求の範囲第 9 項の医薬。
- 1 6. 循環器系疾患が心臓疾患である請求の範囲第 1 0 項の医薬。

図1

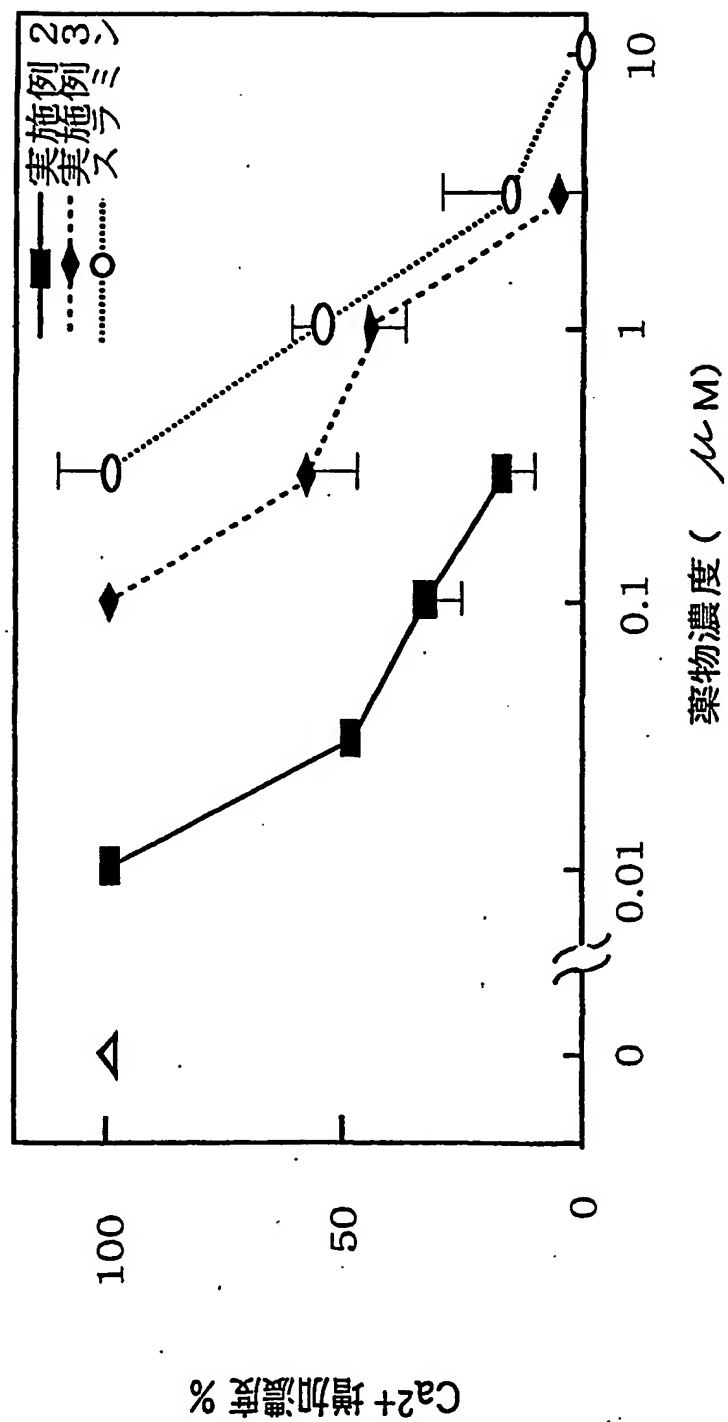


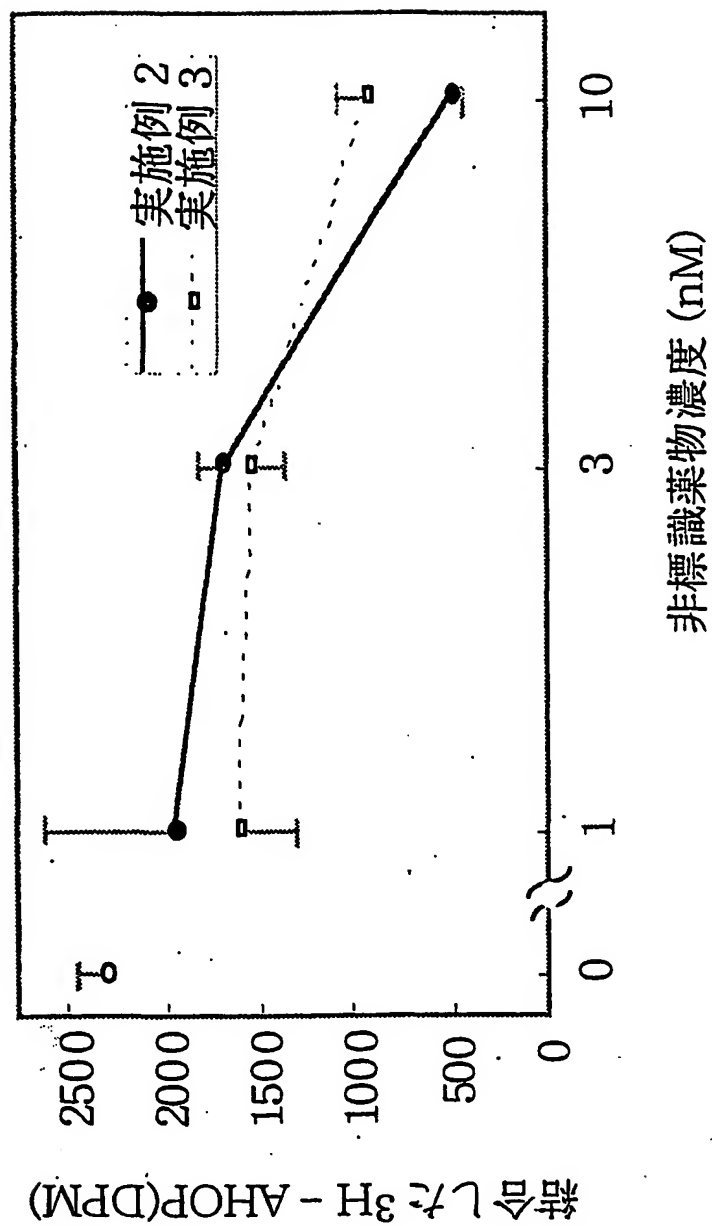
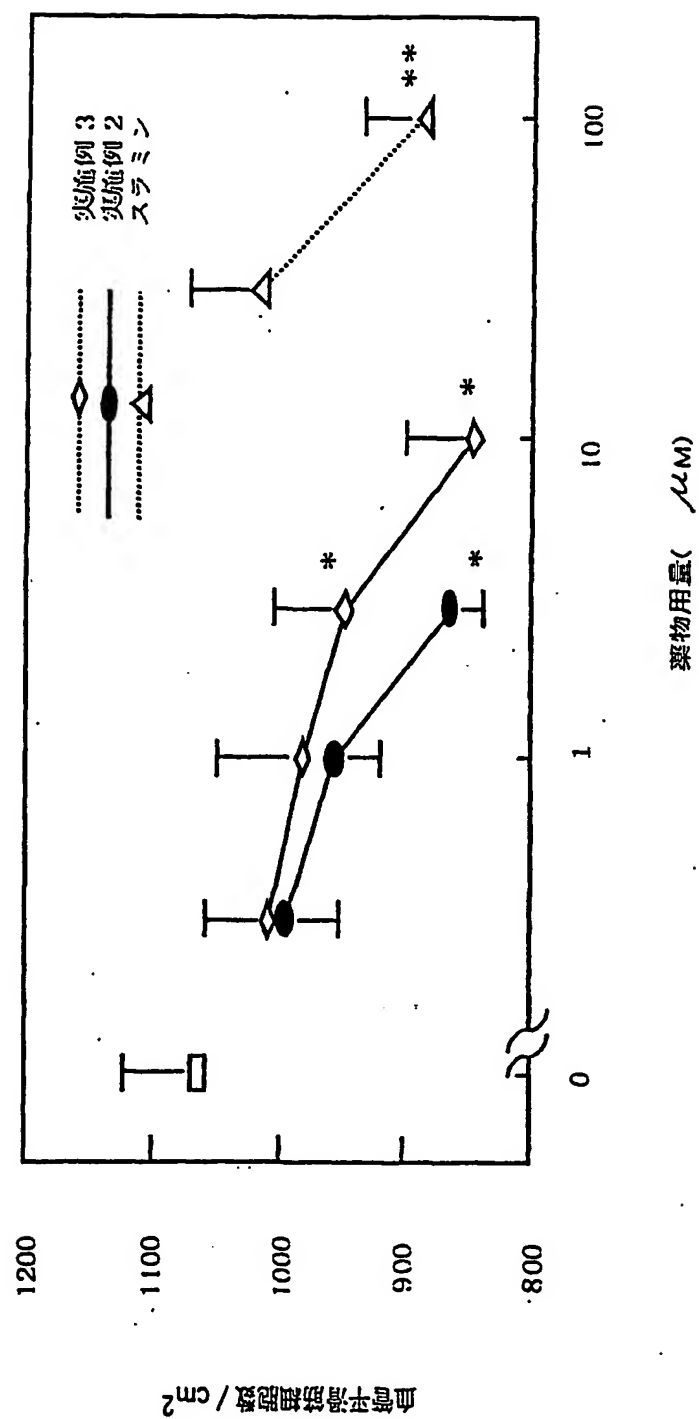
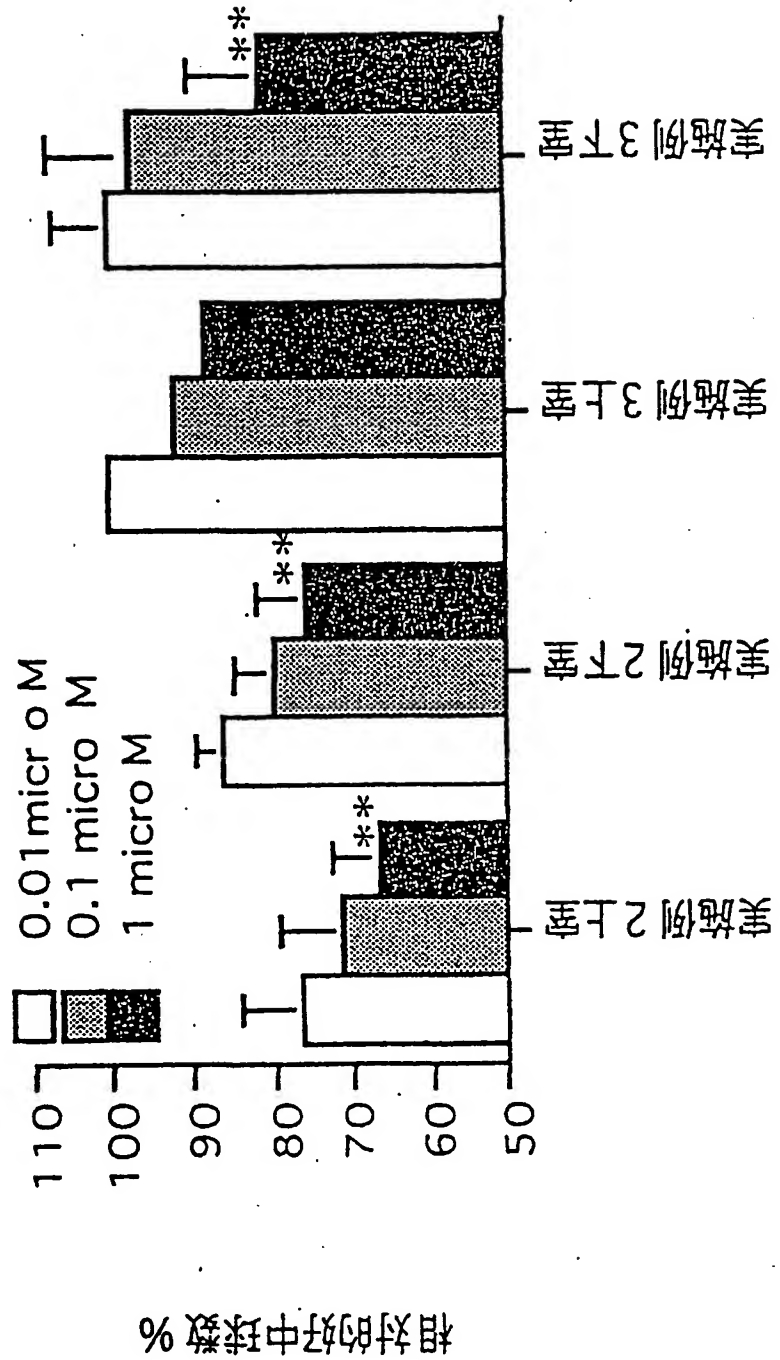
図2. ^3H -AHOP競合実験の用量依存性

図3





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C235/08, 231/12, 231/18,
A61K31/164, A61P9/00, 9/10, 35/00, 29/00, 27/02
A61P3/10, 11/00 // C07M7;00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C235/08, 231/12, 231/18,
A61K31/164, A61P9/00, 9/10, 35/00, 29/00, 27/02
A61P3/10, 11/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN) , REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORI, Kenji et al., Synthesis of sphingosine relatives. Part XVII. Synthesis of 2S,2'R,3R,3'E,4E,8E)-1-O- (β -D-glucopyranosyl)-N-(2'-hydroxy-3'-octadecenoyl)- 9-methyl-4,8-sphingadienine (Pen II), the major cerebroside isolated from <i>Penicillium funiculosum</i> as the fruiting-inducer against <i>Schizophyllum commune</i> , Liebigs Ann., 1996, No.1, pp.1-6	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 December, 2001 (17.12.01)

Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C235/08, 231/12, 231/18,
A61K31/164, A61P9/00, 9/10, 35/00, 29/00, 27/02
- A61P3/10, 11/00 // C07M7:00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C235/08, 231/12, 231/18,
A61K31/164, A61P9/00, 9/10, 35/00, 29/00, 27/02
A61P3/10, 11/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MORI, Kenji et al., Synthesis of sphingosine relatives. Part XVII. Synthesis of (2S, 2' R, 3R, 3' E, 4E, 8E)-1-O-(β -D-glucopyranosyl)-N- (2'-hydroxy-3'-octadecenoyl)-9-methyl-4,8-sphingadienine (Pen II), the major cerebroside isolated from <i>Penicillium</i> <i>funiculosum</i> as the fruiting-inducer against <i>Schizophyllum</i> <i>commune</i> , Liebigs Ann., 1996, No.1, p.1-6	1~16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.12.01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本堂 裕司

4H

9049

電話番号 03-3581-1101 内線 3443